Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik
der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. L. Koslowski

Vergleichende Untersuchung der Gallensäuren DC, CDC, UDC, TC und DHC bezüglich ihrer Wirkung auf die Enzyme LDH-1, LDH-5, GOT und GPT

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
der Medizinischen Fakultät
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
Cornelie Rodloff
aus Stuttgart

1983

Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik
der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. L. Koslowski

Vergleichende Untersuchung der Gallensäuren DC, CDC, UDC, TC und DHC bezüglich ihrer Wirkung auf die Enzyme LDH-1, LDH-5, GOT und GPT

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
der Medizinischen Fakultät
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
Cornelie Rodloff
aus Stuttgart

1983

Dekan:	Professor Dr. W. Frommhold
1. Berichterstatter:	Privatdozent Dr. Dr. K. Schmidt
2. Berichterstatter:	Privatdozent Dr. W. Heitland

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

REFO-DRUCK HANS VOGLER TÜBINGEN

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	Einleitung	1
2.	Allgemeiner Teil	3
2.1.	Die Enzyme	3
2.1.1.	LDH (LDH-1 und LDH-5)	3
2.1.2.	Die Transaminasen	5
2.1.2.1.	GPT	6
2.1.2.2.	GOT	6
2.2.	Die Gallensäuren	7
2.2.1.	Chemische Eigenschaften	7
2.2.2.	Synthese der Gallensäuren	9
2.2.3.	Der enterohepatische Kreislauf der Gallensäuren	10
2.2.4.	Bedeutung der Gallensäuren	11
2.2.5.	Auswahl der Gallensäuren	12
2.2.6.	Mizellenbildung der Gallensäuren auf Grund hydrophober Wechselwirkungen	14
2.2.7.	Wechselwirkung zwischen Protein und den verwendeten Gallensäuren	17
3.	Materialien	19
4.	Methoden	21
4.1.	Enzyminkubation mit Gallensäuren	21
4.2.	Wahl der Pufferlösung	21
4.3.	Anmerkungen zu den Gallensäurelösungen	22
4.4.	Bestimmung der Enzymaktivität	23
4.5.	Anmerkungen zur Aktivitätsbestimmung von GOT und GPT	23
4.6.	Statistik	23
4.7.	Übersicht	24
5.	Ergebnisse	25
5.1.	Wirkung der Gallensäuren auf LDH-5	25
5.2.	Beeinflussung von LDH-5 durch DC, gelöst in verschiedenen Pufferlösungen	28
5.3.	Wirkung der Gallensäuren auf LDH-1	29
5.4.	Wirkung der Gallensäuren auf GPT	31

		Seite
5.5.	Wirkung der Gallensäuren auf GOT	33
5.6.	Zusammenfassung der Ergebnisse	34
5.7.	Wirkung der Gallensäuren auf die Hilfsenzyme LDH und MDH der Monotests	36
6.	Diskussion	37
6.1.	Methode der Aktivitätsmessung der mit Gallensäuren inkubierten Enzyme	37
6.1.1.	Monotest LDH opt.	37
6.1.2.	Monotest GPT opt.	38
6.1.3.	Monotest GOT opt.	39
6.1.4.	Zusammenfassung	39
6.2.	Wechselwirkung der Gallensäuren mit LDH	40
6.2.1.	LDH (LDH-1 und LDH-5)und Desoxycholsäure	40
6.2.2.	Auswirkung der verschiedenen Pufferlösungen auf die Desoxycholsäure-Wirkung bei LDH-5	44
6.2.3.	LDH (LDH-1 und LDH-5) und Cheno- bzw. Ursodesoxycholsäure	47
6.2.4.	LDH (LDH-1 und LDH-5) und Tauro- bzw. Dehydrocholsäure	48
6.3.	Wechselwirkung der Gallensäuren mit GPT	49
6.4.	Wechselwirkung der Gallensäuren mit GOT	50
6.5.	Wirkungsmechanismus bei der Inaktivierung von LDH, GOT und GPT	50
6.6.	Rolle der Gallensäuren in der Diagnostik von Serumenzymen	52
6.6.1.	Enzymdiagnostik bei Lebererkrankungen	52
6.6.2.	Desoxycholsäure als Hilfsmittel in der Diagnostik der Serum-LDH	54
6.7.	Cholesteringallensteintherapie mit CDC und UDC	55
6.8.	Ist eine Enzyminaktivierung in vivo möglich	57
7.	Zusammenfassung	60
8.	Tabellarischer Anhang	62
9.	Literaturverzeichnis	66

Verzeichnis der Abkürzungen

Apo-LDL:	Apo-Low-Density-Lipoprotein
ATP:	Adenosintriphosphat
C:	Cholsäure (3α-7α-12α-Trihydroxy-5β-Cholansäure)
CDC:	Chenodesoxycholsäure (3α-7α-Dihydroxy-5β-Cholansäure)
CMC:	Critical Micelle Concentration
DC:	Desoxycholsäure (3α-12α-Dihydroxy-5β-Cholansäure)
DHC:	Dehydrocholsäure (3,7,12-Triketo-5β-Cholansäure)
EDTA:	Äthylendiamin-tetraessigsäure
ER:	Endoplasmatisches Reticulum
GOT:	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (EC 2.6.1.1)
GPT:	Glutamat-Pyruvat-Transaminase (EC 2.6.1.2)
HMG-CoA-Reduktase:	Hydroxymethylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase (EC 1.1.1.34)
LC:	Lithocholsäure (3α-Monohydroxy-5β-Cholansäure)
LDH:	Lactat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.27)
MDH:	Malat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.37)
SEM:	Standardfehler des Mittelwertes
TC:	Taurocholsäure (3α-7α-12α-Trihydroxy-5β-Taurocholansäure)
UDC:	Ursodesoxycholsäure (3α-7β-Dihydroxy-5β-Cholansäure)
U/l:	Units pro Liter

1. EINLEITUNG

Die Gallensäuren sind organische Säuren, die in hoher Konzentration in der Gallenflüssigkeit enthalten sind und eine charakteristische, vom Cholesterin abgeleitete Struktur aufweisen. Ihre Funktion und Verteilung im menschlichen Organismus waren lange Zeit Gegenstand der Spekulation. Zwar gelangte man bereits Ende des letzten Jahrhunderts zu der Auffassung, daß die Gallensäuren in der Galle als Lösungsmittel für Lezithin und Cholesterin fungieren und folglich bei der Exkretion wasserunlöslicher endogener Lipide mitwirken (37). Jedoch erst mit der Strukturaufklärung der Gallensäuren in der ersten Hälfte dieses Jahrhunderts, die gleichzeitig mit der des Cholesterins erfolgte, begann man, die physiologischen Funktionen und den Wirkungsmechanismus dieser Steroidgruppe eingehender zu untersuchen (92).

1936 erwähnte G.S. Hartley (30) erstmals die amphipathische Struktur der Gallensäuren, die unter bestimmten Bedingungen in wäßrigen Lösungen zu Mizellen aggregieren können. Er wurde durch die Arbeiten von Roepke und Mason 1940 (71) und McBain et al. 1941 (57) bestätigt. Daraufhin folgte eine Flut von Veröffentlichungen, die sich alle mit den mizellaren Eigenschaften der Gallensäuren befaßten.

Jedoch erst 1956, fast 100 Jahre nach Bekanntwerden der Existenz der Gallensäuren, entdeckte man ihre hepatotoxische Wirkung, die um so erstaunlicher war, als die Gallensäuren in der Leber selbst gebildet werden. Bei der Verfütterung von Ochsengalle an Kaninchen beobachtete Holsti (36) nämlich nach einiger Zeit die Entwicklung einer Leberzirrhose. Er führte dies auf die Wirkung der Lithocholsäure zurück. Seitdem wird diesem Aspekt der Wechselwirkung von Gallensäuren mit der Leber in der Gastroenterologie zunehmende Beachtung geschenkt.

Zahlreiche Arbeiten befaßten sich dabei mit der Morphologie des Leberparenchyms nach Einwirken verschiedener Gallensäuren (18,20,47,69), die zu diesem Zweck häufig entweder oral (23,36,41,47) verabreicht oder intravenös infundiert (26,28,

60) wurden. Veränderungen wie Dilatation der Canaliculi, Rarefizierung der Mikrovilli, Hyperplasie des Golgiapparates und Vermehrung des glatten endoplasmatischen Reticulums wurden u.a. in diesem Rahmen beobachtet (7,16,18,20, 25,39,40,43,49,59,69,84). Die Frage nach dem primären Angriffspunkt der Gallensäuren in der Leberzelle und damit der diesen Phänomenen zugrunde liegenden Ursachen konnte dadurch jedoch nicht beantwortet werden. Z.T. ist dies wohl darauf zurückzuführen, daß, durch den Versuchsaufbau bedingt, zu viele unbekannte Faktoren eine kausale Interpretation der Ergebnisse erschweren.

Aus diesem Grund erschien es interessant, bei der Untersuchung der Gallensäurewirkung von relativ einfachen Fragestellungen auszugehen, um die Zahl der beteiligten Faktoren möglichst gering zu halten. Eine in diesem Zusammenhang interessant erscheinende Arbeit wurde von Lehnert et al. 1979 (45) veröffentlicht, in der sie eine hemmende Wirkung der Gallensäure Desoxycholsäure auf das Enzym LDH-5 beschrieben, im Gegensatz dazu jedoch keine Beeinflussung der LDH-1 durch Desoxycholsäure feststellen konnten.

Ausgehend von dieser Beobachtung ergab sich die Frage, ob auch andere Gallensäuren in ähnlicher Weise mit LDH-1 bzw. LDH-5 reagieren könnten und ob auch andere Zellenzyme einen vergleichbaren Effekt zeigten.

Mit der vorliegenden Arbeit sollte daher versucht werden, die Wechselwirkung zwischen verschiedenen in der Natur vorkommenden oder therapeutisch verwendeten Gallensäuren und wichtigen Zellenzymen eingehend zu untersuchen. Anhand von in vitro Versuchen wurde die Auswirkung der oben angeführten Gallensäuren auf die Zellenzyme LDH-1, LDH-5, GOT und GPT geprüft.

Zunächst soll jedoch eine eingehende Beschreibung der Enzyme LDH-1, LDH-5, GOT und GPT gegeben werden. Außerdem soll der neueste Stand der Forschung über die verwendeten Gallensäuren DC, CDC, UDC, TC und DHC und ihre Eigenschaften dargelegt werden.

2. ALLGEMEINER TEIL

2.1. Die Enzyme

Die Untersuchung der Toxizität von Gallensäuren in bezug auf den Leberzellstoffwechsel wirft das Problem auf, daß bei der Wechselwirkung zwischen den Gallensäuren und der Zelle viele, oft unbekannte Faktoren beteiligt sind. Der Wirkungsmechanismus ist daher im Einzelnen nur schwer zu erkennen. Es schien infolgedessen angebracht, sich auf die Untersuchung solcher Wechselwirkungen zu beschränken, die auf möglichst wenige Faktoren zurückgeführt werden konnten.

Aus diesem Grund wurden Untersuchungen über die Auswirkung der Gallensäuren auf einzelne Zellbestandteile, nämlich auf Enzyme, durchgeführt. Als Testenzyme wurden die beiden Transaminasen GOT und GPT und das leberspezifische Isoenzym LDH-5 im Vergleich zum leberunspezifischen Isoenzym LDH-1 gewählt. Zum einen spielen diese Enzyme in der Diagnostik von Leberkrankheiten eine wichtige Rolle, zum anderen haben sie eine zentrale Bedeutung für den Stoffwechsel jeder Zelle.

2.1.1. LDH (LDH-1 und LDH-5) (EC 1.1.1.27)

Die LDH stellt das Zentrum eines subtil ausbalancierten Gleichgewichts zwischen Katabolismus und Anabolismus von Kohlenhydraten dar. Einerseits ist LDH nämlich das terminale Enzym der anaeroben Glykolyse und durch die Regeneration von NAD^+ bei der Pyruvatreduktion wichtig für weitere anaerobe ATP-Gewinnung. Andererseits wird aus dem Skelettmuskel anfallendes Lactat durch die LDH der Gluconeogenese zugeführt. Dieser Prozeß findet vorwiegend in der Leber statt.

Die Lactatdehydrogenase setzt sich aus vier Untereinheiten zusammen. Da diesen Untereinheiten infolge der Anpassung an aerobe oder anaerobe Bedingungen zwei verschiedene Polypeptidketten M und H unterschiedlicher Aminosäuresequenz zugrunde liegen, unterscheidet man insgesamt fünf Isoenzyme:

LDH-1 (H_4), LDH-2 (MH_3), LDH-3 (M_2H_2), LDH-4 (M_3H), LDH-5 (M_4). Die Isoenzymausstattung verschiedener Organe variiert nun sehr stark: Im Herzen findet man z.B. hauptsächlich LDH-1 (78% bei der Ratte), wohingegen LDH-5 im Skelettmuskel und in der Leber den Hauptteil ausmacht (ca. 95% bei der Ratte) (22).

Obwohl diese beiden Isoenzyme LDH-1 und LDH-5 dieselbe Reaktion katalysieren (Pyruvat +NADH+H^+ -- Lactat + NAD^+), sind signifikante Unterschiede zu verzeichnen, z.B. in der Aminosäuresequenz, der helikalen Struktur, der Michaeliskonstanten und anderen strukturellen und kinetischen Eigenschaften (66). Auch die aktiven Zentren der Untereinheiten M und H unterscheiden sich in der Struktur; ob es sich dabei nur um die Tertiärstruktur handelt oder aber auch um die Aminosäuresequenz, ist noch nicht geklärt (22).

Die Elektrophorese stellt eine relativ einfache Methode dar, um diese beiden Isoenzyme voneinander zu trennen, da LDH-1 auf Grund ihrer Oberflächenladung zur Anode, LDH-5 dagegen zur Kathode läuft.

Durch die Aufklärung der Aminosäuresequenz der Untereinheiten M und H (90) wird deutlich, daß der Prozentsatz an hydrophoben Aminosäuren (Alanin, Valin, Tryptophan, Tyrosin, Leucin, Methionin, Phenylalanin) in der Untereinheit M viel höher ist als in der Untereinheit H (45). LDH-5 scheint daher mehr hydrophobe Bezirke auf seinem Molekül aufzuweisen als LDH-1.

Allen Isoenzymen gemeinsam ist das Molekulargewicht von ca. 140000, da beide Untereinheiten trotz starker Abweichungen in der Aminosäuresequenz ihr Molekulargewicht (ca. 35000) während der Evolution konstant gehalten haben.

Die Bindungsstellen, an denen die Untereinheiten zur Quartärstruktur zusammengefügt werden, sind nach (22) ziemlich ähnlich, wenn nicht sogar identisch. Als zwischenmolekulare Kräfte, die den Zusammenhalt der Untereinheiten gewährleisten, werden nach (22) hauptsächlich die Ionenpaarbindung und die H-Brückenbindung angenommen. Hydrophobe Wech-

selwirkungen sollen keine entscheidende Bedeutung für den Zusammenhalt haben, sind aber möglicherweise wichtig für die Stabilisation der tetrameren Form. Neuerdings wird ein Regulatorpeptid angenommen, das die Assoziations-Dissoziationsgleichgewichte der Tetramere beeinflussen soll.

Während der Katalyse reagiert jede Untereinheit unabhängig von der anderen (8). Möglicherweise kommt es dabei zur Konformationsänderung des LDH-Komplexes, wahrscheinlich sogar zur Dissoziation des Tetramers (22,27). Über die enzymatische Aktivität der LDH-Monomere gehen die Meinungen auseinander. Einige Studien weisen darauf hin, daß auch die Monomere eine gewisse katalytische Aktivität entfalten können (22). Andere Autoren stehen dieser Auffassung ablehnend gegenüber (12,53).

Die Bindung des Coenzyms $NADH+H^+$ an das Enzym, die der des Substrates vorausgeht, hat Einfluß auf die Faltung und Interaktion der Polypeptidketten (48). Bei allen Isoenzymen scheint die Coenzymbindung eine Konformationsänderung um das aktive Zentrum herum zu verursachen (14,32,94), die wahrscheinlich hydrophobe Bezirke in unmittelbarer Nachbarschaft des Nicotinamidringes entstehen läßt (17,22). Es wurde dabei keine Abhängigkeit der Untereinheiten voneinander in der Bindung des Coenzyms festgestellt. Die Substratbindungsstelle soll sich ebenfalls in unmittelbarer Nähe des Nicotinamidringes am aktiven Zentrum befinden. Außerdem wird vermutet, daß das Pyruvat während der Katalyse vorübergehend kovalent an den NAD^+-Ring gebunden wird (22).

2.1.2. Die Transaminasen

GOT und GPT gehören zu den wichtigsten Transaminasen des Organismus. Sie spielen beim Anabolismus und Katabolismus vieler Aminosäuren eine wichtige Rolle, wobei die NH_2-Gruppen aus den verschiedenen Aminosäuren auf nur eine einzige, nämlich Glutaminsäure, übertragen werden. Zudem soll GPT den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt in der Gluconeoge-

nese katalysieren (89). Alle Enzyme befinden sich im Zytoplasma - GOT und geringe Mengen von GPT außerdem noch in den Mitochondrien - und wären daher für die Gallensäuren nach Durchdringen der Zellmembran relativ leicht erreichbar.

2.1.2.1. GPT (EC 2.6.1.2)

Das Wissen um den molekularen Aufbau von GPT ist derzeit noch sehr lückenhaft. Elektrophoretisch lassen sich nach (89) zwei Isoenzyme unterscheiden: die vorwiegend im Zytoplasma lokalisierte GPT-C und die aus den Mitochondrien stammende GPT-M.

Interessanterweise sollen beide Isoenzyme die gleiche Michaeliskonstante K_M besitzen. Ihr Molekulargewicht beträgt etwa 180000. Diese Bestimmung wurde jedoch nach (89) an relativ unreinem Präparat durchgeführt. Daher ist noch nicht bekannt, ob das Molekulargewicht beider Isoenzyme identisch ist, so daß man diese Angaben eher als orientierenden Richtwert verstehen sollte.

Die Bindung des Coenzyms Pyridoxalphosphat an das GPT-Apoenzym ist sehr fest und kann nur durch Erhitzen (60°) und nachfolgende Alkalisierung oder Säureeinwirkung (z.B. Ammoniumsulfat) abgespalten werden. Während diese Coenzymbindung an GPT wahrscheinlich fester ist als die an GOT, soll das GPT-Apoenzym eine größere Labilität als das GOT-Apoenzym aufweisen (89), so daß es bei einer Isolierung leichter zu einer irreversiblen Inaktivierung kommen könnte.

Möglicherweise spielen Metallionen bei der Transaminierungsreaktion eine Rolle, da eine Hemmung durch EDTA (10^2mM) und o-Phenathrolin nachgewiesen wurde (89).

2.1.2.2. GOT (EC 2.6.1.1)

Auch über GOT ist zur Zeit noch nicht sehr viel bekannt. Chromatographische und elektrophoretische Untersuchungen ergaben das Vorliegen mehrerer Isoenzyme: die zur Anode wan-

dernde lösliche GOT-C aus dem Zytoplasma und die zur Kathode laufende GOT-M der Mitochondrien. GOT-M ist relativ fest in den Mitochondrien fixiert und tritt normalerweise nicht im Serum auf.Sie läßt sich erst durch Ultraschallbehandlung aus den Mitochondrien lösen. Während GOT-C ein Molekulargewicht von ca. 110000 besitzt bei einer Wechselzahl von 20000 (88), beträgt das Molekulargewicht von GOT-M nur 30000 und die Wechselzahl nur 6000 (88). Gegenüber Temperatureinflüssen scheint die GOT-M weniger beständig zu sein als GOT-C. GOT-M soll insgesamt labiler sein als GOT-C. Das Coenzym Pyridoxalphosphat ist wie bei GPT fest mit dem Apoenzym verbunden, wobei die Bindung an GOT-M wiederum weniger stabil sein soll als die an GOT-C (88). Auch bei GOT konnte durch Zugabe von EDTA eine allerdings nur geringe Hemmung erzielt werden, die durch Fe^{2+}-Substitution wieder aufgehoben wurde (88).

Die in dieser Arbeit verwendete GOT-Suspension aus Schweineherz von Boehringer Mannheim enthielt nur GOT-C (9).

2.2. Die Gallensäuren

2.2.1. Chemische Eigenschaften

Die Gallensäuren gehören zu den wasserlöslichen Lipiden, die aus zwei kovalent verknüpften Anteilen mit gegensätzlichem Löslichkeitscharakter bestehen. In der Galle liegen sie als stark polare, an Glycin bzw. Taurin gebundene Anionen vor (19). Es handelt sich um Derivate des Cyclopentanoperhydrophenanthrens, die wie u.a. auch Cholesterin, Digitalis und die Steroidhormone zur Gruppe der Steroide gezählt werden. Von den übrigen körpereigenen Steroiden (Östrogene, Androgene, Cholesterin,...usw.) unterscheiden sie sich jedoch durch ihre sterische Konfiguration:

Sie gehören zur 5-ß-Androstanreihe der Steroide, d.h. sie weisen eine cis-ständige Verknüpfung der Ringe A und B und eine trans-ständige Verknüpfung von B-C und C-D auf. Der gesättigte Steroidkern trägt α-orientierte polare Hydroxyl-

gruppen am C_3- und C_7- (Chenodesoxycholsäure), C_3- und C_{12}- (Desoxycholsäure) oder C_3-, C_7- und C_{12}-Atom (Cholsäure) (19). Eine stark hydrophile Carboxylgruppe am C_{24}-Atom der Seitenkette bedingt den Säurecharakter der Gallensäure. In alkalischen Lösungen bildet diese eine stark polare Gruppe (dissoziiert, $pH > pK_s$), die zusammen mit den Hydroxylgruppen für die Wasserlöslichkeit der Gallensäuren verantwortlich ist (10).

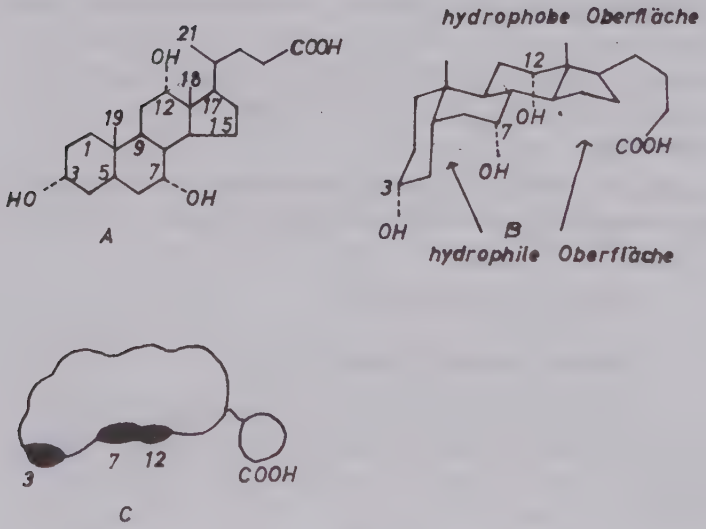


Abb. 1: Cholsäure (3α-7α-12α-Trihydroxy-5ß-Cholansäure)
A: konventionelle Strukturformel
B: perspektivische Strukturformel
C: vereinfachte Darstellung der räumlichen Anordnung der hydrophilen und hydrophoben Anteile

Die perspektivische Zeichnung in Abb. 1 verdeutlicht, daß die hydrophilen Gruppen (-OH, $-COO^-$) unterhalb des Moleküläquators und der hydrophobe Hauptteil des Steroidgerüstes mit seinen Methylgruppen oberhalb des Äquators liegen (10). Durch die Beweglichkeit der Seitenkette kann die polare

Carboxylgruppe in derselben Ebene wie die OH-Gruppen zu liegen kommen und so die Polarität der konvexen Molekülseite verstärken. Das Gallensäuremolekül besitzt somit amphipathischen Charakter, d.h. es ist sowohl in Wasser als auch in Öl löslich. In einem Öl-Wasser-Gemisch liegt das Gallensäuren-Monomer an der Grenzfläche zwischen hydrophobem und hydrophilem Medium, wobei die konvexe Oberfläche des Steroidkerns mit dem lipophilen Milieu in Berührung kommt, während die polyhydroxylierte konkave Oberfläche eher den Kontakt mit dem wäßrigen Medium sucht (10).

Unter physiologischen Bedingungen kommen die Gallensäuren vorwiegend in der sogenannten konjugierten Form vor (68). Dabei wird die Carboxylgruppe der Seitenkette zusätzlich mit Taurin oder Glycin peptidisch verknüpft, wodurch sich die Gesamtpolarität und damit die Wasserlöslichkeit des Moleküls erhöht.

2.2.2. Synthese der Gallensäuren

Die Synthese der Gallensäuren findet ausschließlich in der Leber statt. Sie werden in den Hepatozyten aus Cholesterin unter Mitwirkung von mikrosomalen (Ring- und Seitenkettenhydroxylierung) und mitochondrialen (thiolytische Seitenkettenhydroxylierung) Enzymen gebildet (74,86). Die Regulation der Synthese erfolgt durch das mikrosomale Enzym Cholesterin-7α-hydroxylase (EC 1.14.-.-).

In der Leber werden unter physiologischen Bedingungen nur zwei Gallensäuren, die sogenannten "primären" Gallensäuren Cholsäure (3α-,7α-,12α-Trihydroxy-5β-Cholansäure) und Chenodesoxycholsäure (3α-,7α-Dihydroxy-5β-Cholansäure) gebildet. Nach der Synthese werden diese wiederum im glatten endoplasmatischen Reticulum der Leberzelle mit Hilfe von ATP und Coenzym A an Glycin oder Taurin gekoppelt.

Aus den primären Gallensäuren entstehen im Darm unter dem Einfluß einiger streng anaerober Bakterienstämme die sekundären Gallensäuren: Nach der Dekonjugierung der primären Gallensäuren werden die Hydroxylgruppen in der 7. oder 12.

Position dehydriert oder in der 7. Position dehydroxyliert. Z.B. wird Cholsäure zu Desoxycholsäure (3α-12α-Dihydroxy-5ß-Cholansäure) und Chenodesoxycholsäure zu Lithocholsäure 7-α-hydroxiliert (3α-Monohydroxy-5ß-Cholansäure).

2.2.3. Der enterohepatische Kreislauf der Gallensäuren

Die primären Gallensäuren werden in der Leber kontinuierlich produziert und in Form von Mizellen aktiv in die Gallencanaliculi sezerniert (74).

Durch das abführende Gallengangsystem gelangen sie in den Darm und werden dort größtenteils in konjugierter Form im distalen Ileum aktiv rückresorbiert (74). Nach Passage durch die Darmwand gelangen sie mit dem Pfortaderblut in die Leber, wo sie sofort und nahezu vollständig von den Hepatozyten in einem carrierabhängigen Prozess aufgenommen werden. Die Gallensäuren unterliegen somit einem enterohepatischen Kreislauf, wobei der tägliche fäkale Verlust von ca. 100-300 mg durch Synthese in der Leber ersetzt wird. Auch bei großen Gallensäureverlusten, z.B. durch eine Gallenfistel, ist die Leber in der Lage, infolge eines negativen Feed-back-Mechanismus den Gallensäurepool, wahrscheinlich durch Induktion der Cholesterin-7α-hydroxylase, konstant zu halten (35).

Da der menschliche Gallensäurepool relativ klein ist (5-10 mmol = 2-4 g), wird er täglich bis zu sechsmal umgesetzt (ca. zweimal bei jeder Mahlzeit) (34). Durch das gute Extraktionsvermögen der Hepatozyten beträgt die Verweildauer der Gallensäuren dabei im Plasma nur einige Minuten, und die Konzentration der Gallensäuren im peripheren Blut ist äußerst niedrig (2-5 µmol/l) (35). Ins Kolon gelangte Gallensäuren werden durch die Bakterienflora zu freien Gallensäuren entkoppelt und dehydroxyliert. Die dadurch entstehenden sekundären Gallensäuren Desoxycholsäure und Lithocholsäure werden zu etwa einem Drittel bis zur Hälfte rückresorbiert, in der Leber an Glycin oder Taurin konjugiert und

wieder sezerniert (35).

2.2.4. Bedeutung der Gallensäuren

Auf Grund ihrer amphipathischen Struktur sind die Gallensäuren in der Lage, die Lipide Cholesterin und Lezithin in der wäßrigen Gallenflüssigkeit in Lösung zu halten (10). Bei Störung des Gleichgewichtes Cholesterin/Gallensäuren (Überproduktion von Cholesterin oder Mangel an Gallensäuren) kommt es zur Auskristallisierung von Cholesterin aus der übersättigten Gallenlösung und damit zur Bildung von Cholesteringallensteinen. Chenodesoxycholsäure und Ursodesoxycholsäure sind durch Hemmung des geschwindigkeitsbestimmenden Enzyms der Cholesterinsynthese (HMG-CoA-Reduktase (EC 1.1.1.34)) in der Lage, die Gallensteine durch Untersättigung der Galle mit Cholesterin wieder zur Auflösung zu bringen (1,2,15,38,42,52,54,62,73,83,88).

Die Hauptaufgabe der Gallensäuren besteht darin, die Nahrungsfette im Darm durch Herabsetzen der Oberflächenspannung zu emulgieren. Die daraus resultierende Oberflächenvergrößerung begünstigt die lipolytische Aufspaltung der Fettsubstanzen zu resorbierbaren Bruchstücken (Monoglyceride, Fettsäuren), die wiederum durch die Gallensäuren in mizellarer Form in Lösung gehalten werden (68). Außerdem soll in Anwesenheit von Gallensäuren die enterale Fettresorption erheblich beschleunigt werden, da an Gallensäuremizellen gebundene Lipide in der Lage sind, schneller durch die Zellmembran zu diffundieren als freie Fette (35).

Eine weitere Funktion der Gallensäuren besteht in der Aktivierung der Pankreaslipase im Darm, ohne die die Aufspaltung der Triglyceride unmöglich ist (74).

Außerdem sollen die Gallensäuren die Magensekretion hemmen und die Cholesterinsynthese in den Kryptenzellen des Dünndarms unterdrücken (74).

Unter pathologischen Bedingungen (Überschuß an Gallensäuren) können weiterhin die laxierende Wirkung der Gallensäuren im

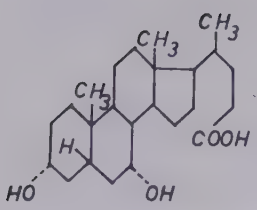
Kolon und die Hemmung des Appetits an Bedeutung gewinnen (74).

2.2.5. Auswahl der Gallensäuren

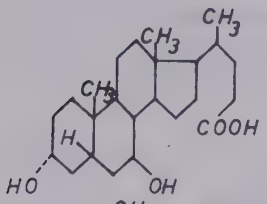
Als Vertreter der primären, unter physiologischen Bedingungen in der Leber vorzugsweise synthetisierten, Gallensäuren wurde die konjugierte Gallensäure Taurocholsäure (TC) ausgewählt. Zum einen liegen nämlich die Gallensäuren beim gesunden Menschen überwiegend in konjugierter Form vor, zum anderen ist die Cholsäuresynthese in der Leber am stärksten ausgeprägt: Es wird zweimal soviel Cholsäure wie Chenodesoxycholsäure gebildet, und Cholsäure macht 40% der Gesamtgallensalze aus (35). Außerdem werden die Gallensäuren in der Leber vorzugsweise an Taurin gekoppelt, da das Glycin/Taurin-Verhältnis der konjugierten Gallensäuren lediglich vom Taurinangebot bestimmt wird (65).

Bei verschiedenen Leberkrankheiten (Leberzirrhose, Hepatitis) wird eine Abnahme des Quotienten Trihydroxygallensäuren/Dihydroxygallensäuren beobachtet. Außerdem soll der Prozentsatz an unkonjugierten Gallensäuren zunehmen (65, 68). Es schien daher interessant, verschiedene unkonjugierte Dihydroxygallensäuren in ihrer Toxizität zu untersuchen und ihre Wirkung sowohl untereinander als auch mit der unter physiologischen Bedingungen vorkommenden TC zu vergleichen: Folgende Dihydroxygallensäuren wurden zu diesem Zweck ausgewählt: Chenodesoxycholsäure (CDC), Ursodesoxycholsäure (3α-7β-Dihydroxy-5β-Cholansäure) (UDC) und Desoxycholsäure (DC).

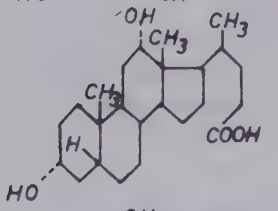
Da CDC im Darm vorzugsweise unverändert bleibt (nur ein Bruchteil wird zu Lithocholsäure umgewandelt), ist sie in der Galle normalerweise ebenso stark vertreten (40%) wie Cholsäure. Außerdem findet CDC in der Cholesteringallensteintherapie Verwendung (1,2,15,38,42,52,54,62,73,83,88). Da auch UDC in der Gallensteintherapie eingesetzt wird (1, 2,15,38,42,52,54,62,73,83,88), und da in klinischen Feldstudien beobachtet wurde, daß der bei CDC festgestellte



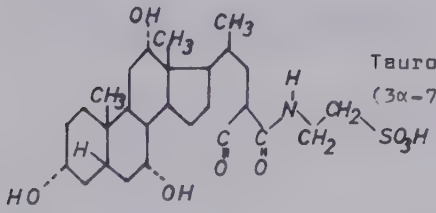
Chenodesoxycholsäure (CDC)
(3α-7α-Dihydroxy-5β-Cholansäure)



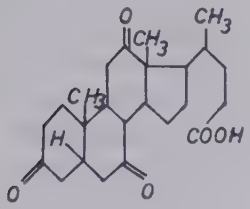
Ursodesoxycholsäure (UDC)
(3α-7β-Dihydroxy-5β-Cholansäure)



Desoxycholsäure (DC)
(3α-12α-Dihydroxy-5β-Cholansäure)



Taurocholsäure (TC)
(3α-7α-12α-Trihydroxy-5β-Tauro-
cholansäure)



Dehydrocholsäure (DHC)
(3,7,12-Triketo-5β-Cholansäure)

Abb. 2: Strukturformeln der verwendeten Gallensäuren

Transaminasenanstieg nach Verabreichung von UDC ausblieb, lag es nahe, die beiden Gallensäuren CDC und UDC in ihrer Wirkung zu vergleichen.

Die sekundäre Gallensäure DC macht unter physiologischen Bedingungen bis zu 20% der Gallensalze aus. In der Literatur (6,13,21) wird DC als stark membranschädigendes Detergens beschrieben. Eine vergleichende Untersuchung der Wirkung der therapeutisch verwendeten Gallensäuren CDC und UDC mit dieser als toxisches Agens bekannten Gallensäure schien also angebracht.

Von der Triketocholansäure Dehydrocholsäure (3,7,12-Trikето-5ß-Cholansäure) (DHC) ist bekannt, daß sie im Vergleich zu allen oben genannten Gallensäuren sich chemisch anders verhält. Da sie außerdem in der Literatur als untoxisch beschrieben wird (6), bot es sich an, diese Gallensäure als Vergleich hinzuzuziehen.

2.2.6. Mizellenbildung der Gallensäuren auf Grund hydrophober Wechselwirkungen

Auf Grund des von Tanford 1972 erstmals beschriebenen "hydrophoben Effektes" (87) zeigen die hydrophoben Anteile der Gallensäuremoleküle die Tendenz, miteinander zu assoziieren, um dadurch den Kontakt des hydrophoben Steroidkerns mit dem polaren Lösungsmittel Wasser zu reduzieren. Diese Gallensäureaggregate, sog. Mizellen, entstehen in wäßrigen Lösungen immer dann, wenn bei Lösungstemperaturen oberhalb der kritischen mizellaren Temperatur (CMT) eine kritische Konzentration, CMC (critical micelle concentration), überschritten wird (10,56,81,82). Unter der CMC versteht man die Konzentration, bei der der Übergang von einer "idealen" (monomeren) Lösung zu einer mizellaren Lösung beginnt. Auch oberhalb der CMC liegen noch Monomere vor, die mit den mizellenbildenden Molekülen in einem dynamischen Gleichgewicht stehen (10). Eine besondere Eigenschaft der Gallensäuren besteht jedoch darin, daß im Gegensatz zu anderen Mizellenbildnern die Zahl der Monomere bei Konzentrationserhöhungen

oberhalb der CMC anfänglich noch weiter ansteigt, wenn auch nicht mehr so stark wie unterhalb der CMC (51). Ausserdem kommt es oberhalb der CMC je nach Art der verwendeten Gallensäure zu einer Erhöhung der Mizellenzahl oder zu einer Mizellenvergrößerung (55).

Diese kritische mizellare Konzentration (CMC) ist kein konstanter Wert. Zum einen ist sie nämlich von der verwendeten Gallensäure abhängig, zum anderen wird sie von der Ionenstärke des Mediums beeinflußt: Je höher die verwendete Ionenkonzentration, desto niedriger ist die Konzentration, bei der die Mizellenbildung einsetzt (10).

Die Größe und Struktur der Gallensäuremizellen wird durch verschiedene Faktoren beeinflußt: Zahl und Lokalisation der Hydroxylgruppen der Gallensäure, ihre Konzentration, der pH-Wert, die Temperatur und die Ionenstärke des Lösungsmittels beeinflussen die Mizellenbildung (10). Z.B. beobachteten Mazer, Carey et al. (55), daß bei konstanter Temperatur, konstantem pH-Wert und konstanter Ionenstärke der Mizellendurchmesser in folgender Reihenfolge abnahm: TDC>TCDC>TUDC> TC.

Die Temperatur hatte einen negativen Einfluß auf das Mizellenwachstum, wohingegen der Mizellendurchmesser bei steigender NaCl-Konzentration zunahm.

Nach der "Primary-Secondary-Micelle"-Hypothese von Small (80) kommt es zunächst zur Bildung von sog. "primären" Mizellen, wobei die beteiligten Moleküle ihre hydrophobe Oberfläche (Steroidkern) zum Innern der Mizellen hin ausrichten, während der hydrophile Anteil mit seinen Hydroxylgruppen und der Carboxylgruppe den Kontakt zum wäßrigen Lösungsmittel herstellt. Maximal zehn Monomere können auf diese Weise mittels hydrophober Kräfte assoziiert werden. Um größere Gallensäure-Aggregate erklären zu können, postulierte Small die Bildung "sekundärer" Gallensäuremizellen: Die Polymerisation primärer Mizellen, vermutlich über intermizellare H-Bindungen benachbarter Hydroxylgruppen, soll zu stäbchenförmigen ("rodlike") sekundären Mizellen führen.

Nach der thermodynamischen Analyse von Mazer, Carey et al. (55) wird die Bildung von sekundären Mizellen durch zwei Faktoren begünstigt:

1. die freie Energie $\Delta\mu_{Hbond}$ der intermizellaren H-Bindungen und
2. die freie Energie $\Delta\mu_{HJ}$ der hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den primären Mizellen.

Demgegenüber wird die Entstehung sekundärer Mizellen durch elektrostatische Abstoßung zwischen den geladenen Gruppen der primären Mizellen erschwert bzw. verhindert.

Nach Mazer, Carey et al. (55) stellen nicht die intermizellaren H-Bindungen die treibende Kraft bei der Bildung sekundärer Mizellen dar, sondern die abstoßenden hydrophoben Interaktionen zwischen den primären Mizellen und dem wäßrigen (polaren) Lösungsmittel. (Wachsen der Mizellen verringert den Kontakt zwischen H_2O und hydrophoben Kohlenwasserstoffen.) Auf Grund der Beobachtung, daß der Mizellendurchmesser in Abhängigkeit von der verwendeten Gallensäure in der Reihenfolge TDC>TCDC>TUDC>TC abnahm, kamen Mazer, Carey et al. (55) zu der Schlußfolgerung, daß Anzahl und Lokalisation der Hydroxylgruppen des Steroidkerns die hydrophoben Kräfte der Gallensäuren beeinflussen. Nach Carey und Koretsky (11) soll Dehydrocholsäure kaum Tendenz zur Mizellenbildung zeigen. Dies läßt darauf schließem, daß die Fähigkeit von Dehydrocholsäure, hydrophobe Wechselwirkungen einzugehen, sehr gering ist.

Die in dieser Arbeit verwendeten Gallensäuren lagen alle bis auf Taurocholsäure in unkonjugierter Form vor. Da die Konjugation mit Taurin das Gallensäuremolekül stärker polarisiert (10,33), kann man davon ausgehen, daß bei unkonjugierten Gallensäuren der hydrophobe Charakter eher verstärkt wird. Wenn also die Hydrophobizität im wesentlichen durch die Anzahl und Lokalisation der Hydroxylgruppen am Cholestangerüst bestimmt wird, so wird erwartungsgemäß bei den in dieser Arbeit verwendeten Gallensäuren die Tendenz zu hydrophoben Wechselwirkungen in folgender Reihenfolge ab-

nehmen: DC>CDC>UDC>TC>DHC.

2.2.7. Wechselwirkung zwischen Protein und den verwendeten Gallensäuren

Über die allgemeine Wechselwirkung zwischen Proteinen und den in dieser Arbeit verwendeten Gallensäuren ist noch nicht allzu viel bekannt. Gallensäuren, insbesondere DC, werden in der Biochemie oft dazu verwendet, Membranenzyme zu isolieren, da sie auf Grund ihrer "milden Detergentienwirkung" die biologische Aktivität der meisten Proteine nicht beeinträchtigen sollen (31,51).

Helenius und Simons haben nachgewiesen (31), daß nicht nur Lipide, sondern auch Proteine in der Lage sind, DC zu binden. Dabei zeigte sich, daß lipophile Proteine (z.B. Membranproteine, Apo-LDL) DC in weitaus größerer Menge zu binden vermochten als hydrophile Proteine (z.B. Albumin). Ihre Untersuchungen ergaben, daß die Proteinbindung von DC sehr wahrscheinlich auf hydrophoben Wechselwirkungen beruht. Dies wurde von Makino, Tanford (51) und Chauveau, Ehrhart (21) bestätigt.

Da nach Tanford (87) die nicht spezifische hydrophobe Wechselwirkung wahrscheinlich generell die treibende Kraft für die Assoziation von amphipathischen Molekülen an Proteinen darstellt, ist anzunehmen, daß auch die in dieser Arbeit verwendeten Gallensäuren eine mehr oder weniger starke hydrophobe Wechselwirkung mit apolaren Bezirken von LDH, GOT und GPT eingehen können. Die Intensität dieser Wechselwirkungen wird dabei wahrscheinlich, wie unter 2.2.6. bereits erläutert, von der Zahl und Anordnung der Hydroxylgruppen am Cholestangerüst beeinflußt.

Durch die drei Ketogruppen wird das Cholestangerüst von DHC stärker als die anderen Gallensäuren polarisiert sein, so daß die hydrophoben Kräfte hier für eine merkliche Wechselwirkung wahrscheinlich nicht ausreichen (Abb. 2,20).

Nach Makino und Tanford (51) findet keine Assoziation zwi-

schen Gallensäuremizellen und Proteinen statt. Nur der freie Anteil der Gallensäure (d.h. die Monomere) ist in der Lage, sich an Proteine zu binden.

Konformationsänderung:
Folgende Überlegungen legen auf Grund der thermodynamischen Untersuchungen von Tanford (87) den Schluß nahe, daß die verwendeten Gallensäuren die Proteinkonformation, also auch die Konformation von Enzymen, verändern können:

Nach Tanford (87) besitzt die vom Lösungsmittel abhängige Konformation eines Proteins nur eine "Grenzstabilität". Andere Proteinfaltungen mit größeren hydrophoben Bezirken an der Oberfläche des Moleküls sind ebenfalls denkbar, werden jedoch bei Lösung des Proteins in polaren Lösungsmitteln (z.B. Wasser) aus thermodynamischen Gründen nicht erreicht, da die frei werdende Energie beim Übergang in diesen Zustand zu gering ist. Unter bestimmten Umständen jedoch ist eine Umfaltung des Proteins möglich, nämlich, wenn Proteine in in einer Mischung aus Wasser und organischem Lösungsmittel gelöst werden. Dann ist diese Konformation nicht mehr von einem energetisch ungünstigen Austausch freier Energie begleitet (87), da nun der unvorteilhafte Energieaustausch bei der Konformationsänderung durch den Energiegewinn bei der Bindung von hydrophoben Liganden ausgeglichen wird (87).

Da auch die Gallensäuren, wie die organischen Lösungsmittel in Tanfords Ausführung, über hydrophobe Eigenschaften verfügen, führen sie wahrscheinlich zu ähnlichen Effekten, und zwar wiederum mit abnehmender Intensität in folgender Reihenfolge: DC>CDC>UDC>TC>DHC.

3. MATERIALIEN

LDH (EC 1.1.1.27)

Bande 5 (M_4) aus Schweinemuskel, in Ammoniumsulfat (3,2 mol/l, pH=6,5) 5 mg/ml, spez. Akt. 450 U/mg von Boehringer, Mannheim, Bestell-Nr. 107115

Bande 1 (H_4) aus Schweineherz, in Ammoniumsulfat (3,2 mol/l, pH=6,5) 5 mg/ml, spez. Akt. 360 U/mg von Boehringer, Mannheim, Bestell-Nr. 107140

GOT (EC 2.6.1.1) aus Schweineherz, in Ammoniumsulfat (3,2 mol/l, pH=6,5), 10 mg/ml, spez. Akt. 200 U/mg von Boehringer, Mannheim, Bestell-Nr. 105554

GPT (EC 2.6.1.2) aus Schweineherz, in Ammoniumsulfat (3,2 mol/l, pH=6,5), 10 mg/ml, spez. Akt. 80 U/l von Boehringer, Mannheim, Bestell-Nr. 105589

Monotests von Boehringer, Mannheim

LDH opt.	Bestell-Nr. 124885
HBDH opt.	Bestell-Nr. 124800
GOT opt.	Bestell-Nr. 124362
GPT opt.	Bestell-Nr. 124524

Desoxycholsäure-Na_4-Salz: rein 95% MG: 415
von Serva, Bestell-Nr. 18330

Chenode oxycholic Acid: rein 95% MG: 393
von Sigma, Bestell-Nr. C-9377

Ursodeoxycholic Acid: rein 95% MG: 393
von Sigma, Bestell-Nr. U-2002

Taurocholic Acid: Sodium Salt, rein 98% MG: 538
von Sigma, Bestell-Nr. T-4009

Dehydrocholsäure: rein 95% MG: 388
von Steraloids, Inc. Wilton, N.H.
C 2000 Hatch 6997

Albumin: aus Rinderserum, lyophilisiert, 92% rein (Cohn Fraktion V), von Serva, Bestell-Nr. 11930

Die gebräuchlichen Laborchemikalien stammen von Merck, Darmstadt.

Als Lösungsmittel wurde zweimal in einer Quarzapparatur destilliertes Wasser verwendet.

4. METHODEN

4.1. Enzyminkubation mit Gallensäuren

Zur Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen den Gallensäuren (DC, CDC, UDC, TC, DHC) und den isolierten Enzymen (LDH-1, LDH-5, GOT, GPT) wurden folgende Experimente durchgeführt:

Je ein Teil einer definierten Enzymsuspension wurde mit je neun Teilen unterschiedlich konzentrierter Gallensäurelösung 60 Minuten lang bei 25°C im Wasserbad inkubiert.

Da die Gallensäurekonzentration unter physiologischen Bedingungen in der Lebergalle bis zu 14 g/l betragen kann und in Anlehnung an die von Lehnert et al. (45) verwendeten Konzentrationsstufen wurden folgende Gallensäurekonzentrationen gewählt:
0,25 g/l; 0,5 g/l; 1,0 g/l; 2,5 g/l; 5,0 g/l; 10,0 g/l (Umrechnung g/l -- mol/l: siehe tab. Anhang).

Die Wirkung jeder Gallensäure auf jedes Enzym wurde geprüft. 5, 30 und 60 Minuten (z.T. mehrere Stunden) nach Zugabe der Gallensäurelösungen wurden Proben entnommen. Diese wurden unmittelbar nach der Entnahme zu den entsprechenden Testansätzen gegeben, um die Enzymaktivität zu bestimmen.

Die Anfangsaktivität der Enzyme wurde so gewählt (siehe tab. Anhang), daß diese eine relativ hohe Aktivität aufwiesen, ohne den sicheren Meßbereich der Monotests von Boehringer Mannheim zu verlassen. Es wurden jeweils frische Enzymsuspensionen verwendet, da nach Einfrieren oder längerem Stehen (eisgekühlt!) Aktivitätsverluste zu beobachten waren.

4.2. Wahl der Pufferlösung

Die Enzyme und Gallensäuren wurden in 1,0 mM EDTA/2,5 mM Tris/HCl-Puffer, pH=7,5 nach (45) gelöst. Denn Vorversuche mit LDH-5 und Desoxycholsäure, gelöst in verschiedenen Pufferlösungen (Tris/HCl-Puffer nach Lehnert et al. (45), Standardmedium mit/ohne Albumin) bei demselben pH-Wert von 7,5,

haben gezeigt, daß die Wirkung der Gallensäuren im Tris/HCl-Puffer (Tab. 1) besonders gut zum Ausdruck kommt.

Standardmedium	Tris/HCl-Puffer
pro 1 l Aqua bidest.:	
122 mM NaCl	2,5 mM Tris/HCl
5,36 mM KCl	1,0 mM EDTA
0,4 mM $MgSO_4 \times 7H_2O$	Ionenstärke 0,007
0,5 mM $MgCl_2 \times 6H_2O$	pH=7,5
0,34 mM $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$	
0,44 mM $KHPO_4$	
1,0 mM $CaCl_2$	
5,05 mM Glucose x H_2O	
22,5 mM $NaHCO_3$	
Ionenstärke 0,21	
pH=7,5 (mit 1n HCl eingestellt)	

Tab. 1: Verwendete Pufferlösungen

4.3. Anmerkungen zu den Gallensäurelösungen

DHC und TC ließen sich problemlos bis zur höchsten verwendeten Konzentration von 10 g/l sowohl im Standardmedium (Tab. 1) als auch im oben genannten Tris/HCl-Puffer (45) lösen.

Die beiden undissoziierten Säuren CDC und UDC konnten bei pH=7,5 weder im Standardmedium noch im Tris/HCl-Puffer, noch in Aqua bidest. in Lösung gebracht werden. Durch Alkalisieren mit 1n HCl-Lösung auf pH≈10 ergab sich eine klare Lösung (Na-Salze der Gallensäuren), aus der die Gallensäuren auch nach längerem Stehen nicht mehr ausfielen.

Die Lösung des Na_4-Salzes der DC im Tris/HCl-Puffer bei pH=7,5 war ohne Schwierigkeiten durchführbar, wohingegen die

Lösung derselben im Standardmedium erst durch folgendes Verfahren möglich wurde:
DC wurde zuerst im Standardmedium ohne Mg^{2+}- und Ca^{2+}-Salze ($MgSO_4$, $MgCl_2$, $CaCl_2$) gelöst, die erst nach Auflösung von DC als Konzentrat zugegeben wurden.

Für jeden Versuch wurden jeweils frisch hergestellte Lösungen verwendet, da bei höheren Gallensäurekonzentrationen nach längerem Stehen teilweise eine Gelbildung zu beobachten war.

4.4 Bestimmung der Enzymaktivität

Die Aktivität der Enzyme wurde photometrisch bei 25°C und 340 nm bestimmt (3,4,5,93). Als Testansatz fanden die entsprechenden Monotests von Boehringer Mannheim Verwendung (siehe 3.). Die Angabe der Aktivitäten erfolgte in U/l (units pro Liter, 1U=1µmol umgesetztes Substrat pro Minute).

4.5. Anmerkungen zur Aktivitätsbestimmung von GOT und GPT

Um auszuschließen, daß die Messung der Aktivität von GPT aus dem Inkubationsansatz mit Gallensäuren durch Wechselwirkungen dieser Gallensäuren mit dem Hilfsenzym LDH im GPT-Monotest verfälscht wurden, wurden zusätzliche Versuche mit einem jeweils 100-fachen LDH-1-Überschuß im Monotestansatz durchgeführt und diese Messungen mit den früheren Ergebnissen ohne LDH-1-Überschuß verglichen.

Das Hilfsenzym MDH im GOT-Testansatz wurde ebenfalls auf seine Hemmbarkeit durch die oben angeführten Gallensäuren untersucht.

4.6. Statistik

Zur Feststellung, ob die Gallensäuren in der Lage waren, die Enzyme signifikant zu inaktivieren, wurde der t-Differenzentest für paarige Zufallsstichproben herangezogen (29,63).

Dabei wurde von einem Signifikanzniveau α=0,05 ausgegangen.

4.7. Übersicht

INKUBATION: bei 25°C, 60 Minuten (oder länger), pH=7,5,
Gallensäuren gelöst im Tris/HCl-Puffer nach (45)
oder im Standardmedium (Tab. 1)
mit/ohne Albumin
Enzyme gelöst im Tris/HCl-Puffer nach (45)

INKUBATIONSANSÄTZE:

je ein Enzym:		+ je eine Gallensäure:	
	LDH-1		DC
	LDH-5		CDC
	GOT		UDC
	GPT		TC
			DHC

MESSUNG der Enzymaktivität
(photometrisch bei 25°C, 340 nm)

5. ERGEBNISSE

5.1. Wirkung der Gallensäuren auf LDH-5 (Abb.3-8)

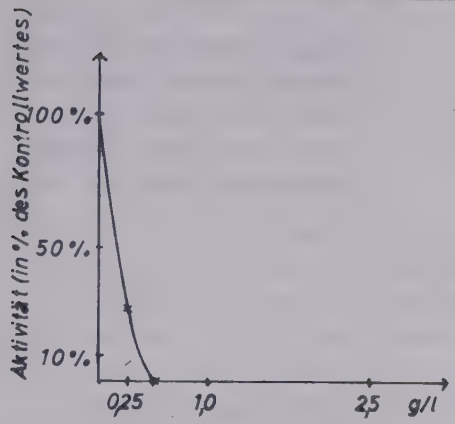


Abb. 3: Konzentrationsabhängige Inaktivierung von LDH-5 durch DC, t=60' (Puffer: Tris/HCl) (n=3) (Absolutwerte±SEM im Anhang)

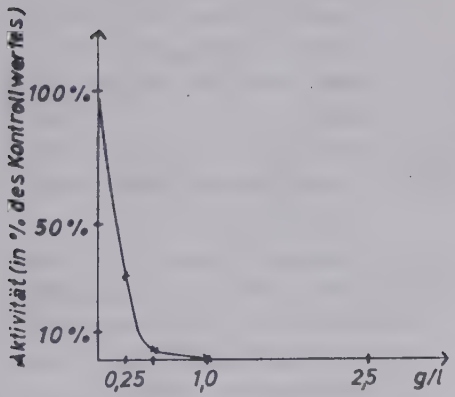


Abb. 4: Konzentrationsabhängige Inaktivierung von LDH-5 durchCDC, t=60' (Puffer: Tris/HCl) (n=2) (Absolutwerte±SEM im Anhang)

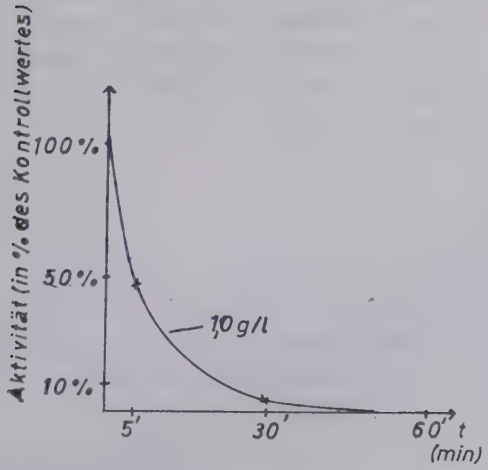


Abb. 5: Zeitverlauf der Inaktivierung von LDH-5 durch CDC, Konzentration: 1,0 g/l CDC (Puffer: Tris/HCl) (n=2) (Absolutwerte±SEM im Anhang)

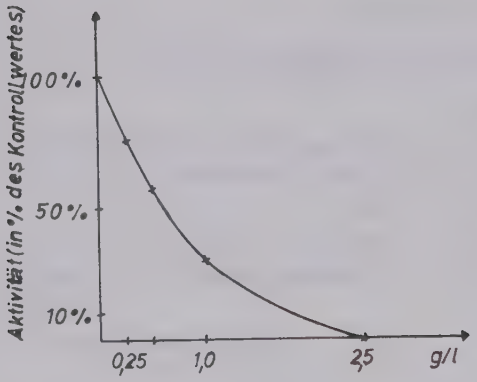


Abb. 6: Konzentrationsabhängige Inaktivierung von LDH-5 durch UDC, t=60' (Puffer: Tris/HCl) (n=2) (Absolutwerte±SEM im Anh.)

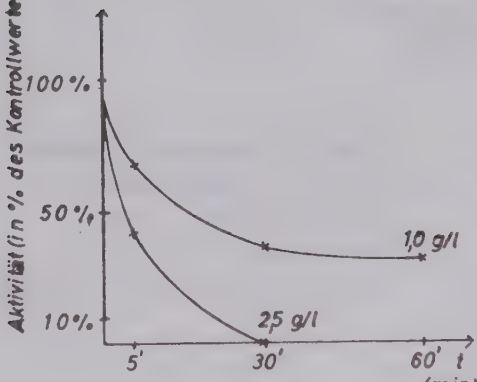
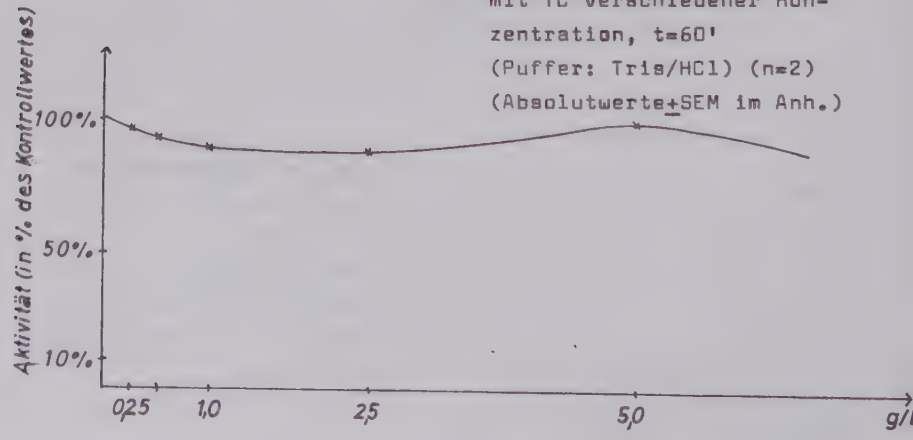


Abb. 7: Zeitverlauf der Inaktivierung von LDH-5 durch UDC, Konzentrationen: 1,0 g/l und 2,5 g/l UDC (Puffer: Tris/HCl) (n=2) (Absolutwerte±SEM im Anh.)

Abb. 8: (siehe unten) LDH-5-Aktivität in % der Kontrolle nach Inkubation mit TC verschiedener Konzentration, t=60' (Puffer: Tris/HCl) (n=2) (Absolutwerte±SEM im Anh.)



Mit Ausnahme von DHC und TC (Abb. 8, Tab. 12 im Anhang) wurde LDH-5 von den untersuchten Gallensäuren signifikant bis auf 0% des Kontrollwertes gehemmt. Bereits nach fünf Minuten Inkubation war ein initialer Abfall der Aktivität zu beobachten. Zudem war eine zeitabhängige Komponente der Enzyminaktivierung festzustellen; denn der Aktivitätsverlust erreichte erst nach 30 bzw. 60 Minuten maximale Werte (Abb. 5,7).

Bei DC fand sich jedoch kein so abrupter Aktivitätsabfall von 92% auf 15% der Kontrolle beim Übergang der Konzentration von 0,25 g/l auf 0,5 g/l, wie es in der Arbeit von Lehnert et al. (45) beschrieben wird. Bereits bei der Konzentration von 0,25 g/l war in diesen Versuchen ein signifikanter Aktivitätsabfall auf 28% des Kontrollwertes zu verzeichnen.

DC und CDC zeigten in ihrer Wirkungsstärke keine signifikanten Unterschiede (Abb. 3,4). Die minimale Hemmkonzentration für einen totalen Aktivitätsverlust betrug in beiden Fällen 0,5 g/l (bei 0,5 g/l CDC: 3% = 12±9 U/l liegt innerhalb des Fehlerbereichs).

Im Gegensatz dazu entfaltete UDC ihre maximale Wirkung erst bei 5-fach höherer Konzentration, nämlich bei 2,5 g/l (Abb. 6).

Konz. (g/l)	DC	CDC	UDC	TC	DHC
Kontrolle	100%	100%	100%	100%	100%
0,25	28%	28%	-	-	94%
0,5	0%	3%	-	-	94%
1,0	0%	0%	31%	112%	101%
2,5	0%	0%	0%	106%	103%
5,0	-	-	0%	112%	-
10,0	-	-	0%	94%	-

Tab 2: LDH-5 inkubiert mit Gallensäuren nach 60 Minuten Inkubation, Konzentration in g/l. LDH-5 und die Gallensäuren wurden im Tris/HCl-Puffer nach (45) gelöst, genaue Zusammensetzung siehe Tab. 1, Absolutwerte und Standardabweichungen im tab. Anhang. (n=2, bei DC n=3)

5.2. Beeinflussung von LDH-5 durch DC, gelöst in verschiedenen Pufferlösungen (Abb. 9,10)

Wie oben bereits erwähnt, war die Hemmwirkung von DC stark von den verwendeten Pufferlösungen abhängig:

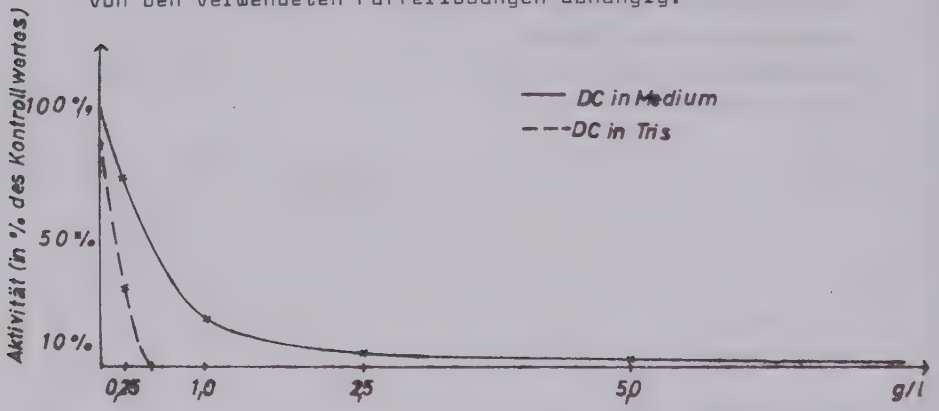


Abb. 9: Vergleich der Wirkung von DC, gelöst im Standardmedium, mit der Wirkung von DC, gelöst im Tris/HCl-Puffer (45) auf LDH-5 (in beiden Versuchen im Tris/HCl-Puffer gelöst), t=60' (n=3) (Absolutwerte±SEM im Anhang)

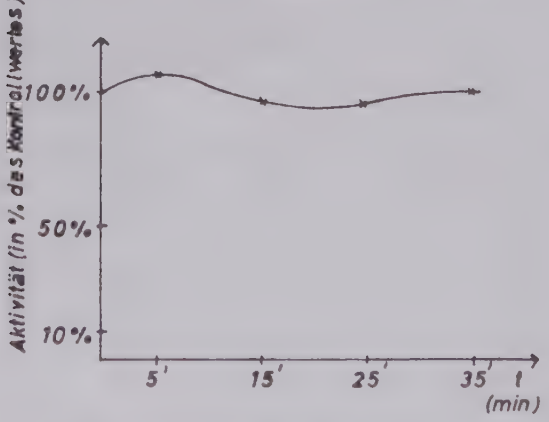


Abb. 10: Ausbleiben der Inaktivierung von LDH-5 (gelöst im Tris/HCl-Puffer) durch DC bei Lösung von DC im Standardmedium + Albumin, Konzentration von DC: 3,0 g/l, Konzentration von Albumin: 26 g/l (Einzelversuch) (Absolutwerte±SEM im Anhang)

DC, in Medium statt in Tris-Puffer nach (45) gelöst, zeigte erst in 5-fach höherer Konzentration (2,5 g/l) eine vergleichbare Wirkung.

Bei Zugabe von Albumin in ca. halbphysiologischer Konzentration (2,6 g%) zum Medium konnte ein Aktivitätsabfall durch DC bei 3,0 g/l nicht mehr beobachtet werden. Eine bereits stattgefundene Hemmung der Enzymaktivität wurde durch anschließende Albuminzugabe innerhalb der Beobachtungszeit von ca. 30 Minuten nicht aufgehoben.

Konz. (g/l)	Tris/HCl	Medium	Medium + Albumin
Kontrolle	100%	100%	100%
0,25	28%	-	-
0,5	0%	-	-
1,0	0%	18%	-
2,5	0%	0%	-
3,0	-	-	114%
	(n=3)	(n=3)	(Einzelversuch)

Tab. 3: LDH-5 (gelöst in Tris/HCl) inkubiert mit DC, gelöst in verschiedenen Pufferlösungen:
1. Tris/HCl nach (45)
2. Standardmedium (Zusammensetzung siehe Tab. 1)
3. Standardmedium + Albumin (26 g/l)
t=60', pH=7,5, Absolutwerte und Standardabweichungen im Anhang

5.3. Wirkung der Gallensäuren auf LDH-1 (Abb. 11,12)

Im Vergleich zu LDH-5 erwies sich das Isoenzym LDH-1 generell als stabiler. Ein vollständiger Verlust der Enzymaktivität konnte nie festgestellt werden. Die Gallensäuren DHC, TC, CDC und UDC zeigten keine signifikante Wirkung auf LDH-1.

Nur DC vermochte LDH-1 zu beeinflussen. Bei einer Konzentration von 2,5 g/l bewirkte DC einen Aktivitätsabfall auf 60% des Kontrollwertes, was den Ergebnissen von Lehnert et al.

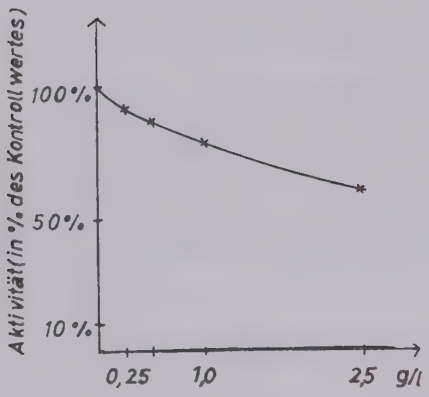


Abb. 11: Konzentrationsabhängige Inaktivierung von LDH-1 durch DC, t=60' (Puffer: Tris/HCl) (n=3) (Absolutwerte±SEM im Anhang)

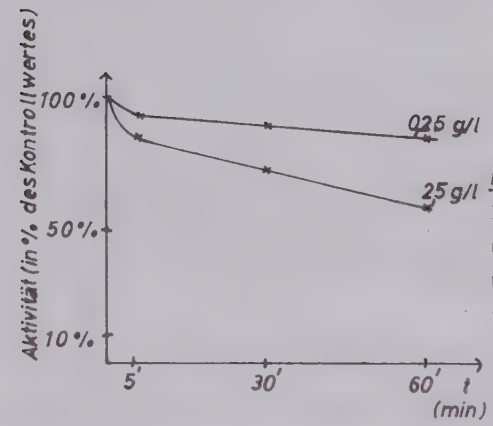


Abb. 12: Zeitverlauf der Inaktivierung von LDH-1 durch DC, Konzentrationen: 0,25 g/l und 2,5 g/l DC (Puffer: Tris/HCl) (n=3) (Absolutwerte±SEM im Anhang)

Konz. (g/l)	DC	CDC	UDC	TC	DHC
Kontrolle	100%	100%	100%	100%	100%
0,25	87%	-	-	-	103%
0,5	89%	-	-	-	103%
1,0	81%	88%	99%	91%	110%
2,5	60%	89%	95%	96%	106%
5,0	-	95%	90%	75%	-
10,0	-	99%	87%	91%	-

Tab. 4: LDH-1 und Gallensäuren, t=60', Konzentrationen in g/l, Gallensäuren im Tris/HCl-Puffer nach (45) gelöst, signifikante Inaktivierung nur bei DC ($\alpha \hat{=} 0,05$) (Absolutwerte±SEM im Anh.) (n=2, bei DC n=3)

widerspricht, die keinen Aktivitätsabfall von LDH-1 beschrieben.

LDH-1 wurde dabei ebenso wie das Isoenzym LDH-5 in Abhängigkeit von der Inkubationszeit inaktiviert.

5.4. Wirkung der Gallensäuren auf GPT (Abb. 13-15)

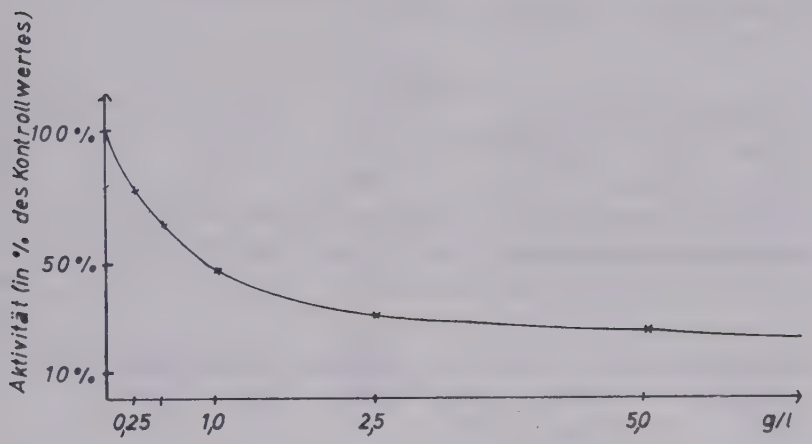


Abb. 13: Konzentrationsabhängige Inaktivierung von GPT durch CDC, t=60' (Puffer: Tris/HCl) (n=2) (Absolutwerte±SEM im Anh.)

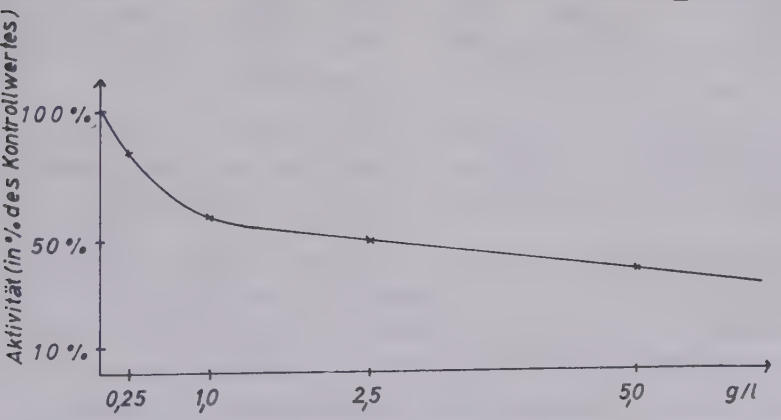


Abb. 14: Konzentrationsabhängige Inaktivierung von GPT durch TC, t=60' (Puffer: Tris/HCl) (n=2) (Absolutwerte±SEM im Anh.)

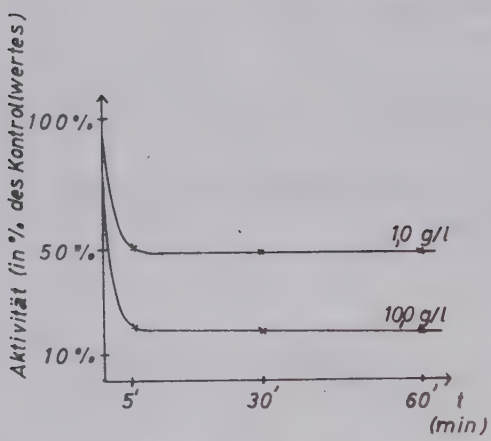


Abb. 15: Zeitverlauf der Inaktivierung von GPT durch CDC, Konzentrationen: 1,0 g/l und 10,0 g/l CDC (Puffer: Tris/HCl) (n=2) (Absolutwerte±SEM im Anhang)

Konz. (g/l)	DC	CDC	UDC	TC	DHC
Kontrolle	100%	100%	100%	100%	100%
0,25	92%	-	-	-	103%
0,5	82%	-	-	-	100%
1,0	71%	48%	73%	58%	109%
2,5	52%	30%	51%	55%	91%
5,0	-	23%	30%	38%	-
10,0	-	18%	16%	28%	-

Tab. 5: GPT und Gallensäuren nach 60 Minuten Inkubation, die Gallensäuren wurden in Tris/HCl nach (45) gelöst,(n=2), Absolutwerte und Standardabweichungen im tab. Anhang.

DHC zeigte hier, wie bei allen anderen Enzymen, keine Hemmwirkung. Die übrigen Gallensäuren CDC, UDC, DC und TC vermochten, GPT initial zu inaktivieren, ohne einen weiteren Aktivitätsverlust über 60 Minuten zu verursachen.

Mit Ausnahme von CDC war kein signifikanter Unterschied in der Wirkung dieser Gallensäuren festzustellen. CDC schien bei 2,5 g/l eine geringfügig stärkere Wirkung zu entfalten

(Tab. 17 im Anhang).

Trotz starker Erhöhung der Konzentration auf 10,0 g/l bei CDC, UDC und TC fiel die Enzymaktivität nur auf ca. 20% der Kontrolle ab (Tab. 5).

5.5. Wirkung der Gallensäuren auf GOT (Abb. 16,17)

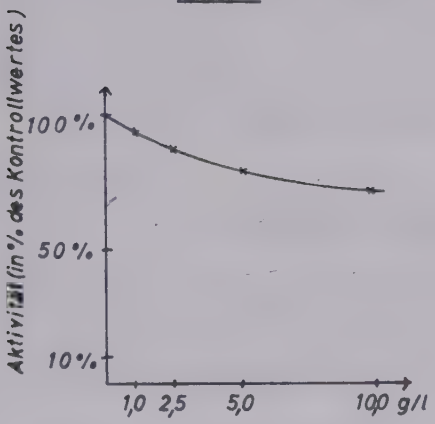


Abb. 16: Konzentrationsabhängige Inaktivierung von GOT durch CDC, t=60' (Puffer: Tris/HCl) (n=2) (Absolutwerte±SEM im Anh.)

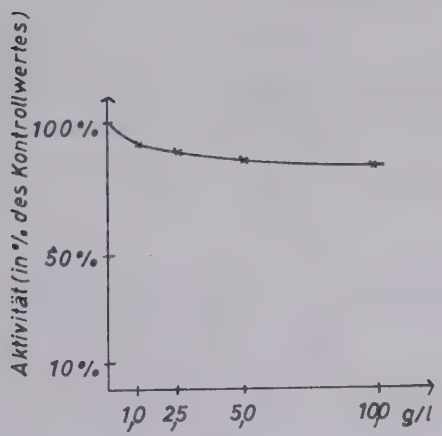


Abb. 17: Konzentrationsabhängige Inaktivierung von GOT durch UDC, t=60' (Puffer: Tris/HCl) (n=2) (Absolutwerte±SEM im Anh.)

GOT erwies sich ebenfalls als relativ stabil gegenüber den Einflüssen der unterschiedlichen Gallensäuren. Auch bei GOT konnte ein totaler Aktivitätsabfall in keinem Versuch nach-

gewiesen werden.

Bei DHC, TC und DC waren selbst bei maximaler Konzentration nach 60 Minuten Inkubation keine signifikanten Unterschiede zum Kontrollwert zu verzeichnen.

UDC und CDC bewirkten im Gegensatz dazu eine initiale Inaktivierung von GOT, wobei die Aktivität jedoch nur auf 87% bzw. 89% des Kontrollwertes bei einer Konzentration von 2,5 g/l abfiel.

Ein weiterer Aktivitätsverlust im Verlauf der Inkubation, d.h. eine zeitabhängige Enzymhemmung konnte hierbei nicht beobachtet werden.

5.6. Zusammenfassung der Ergebnisse

	DC	CDC	UDC	TC	DHC
LDH-5	++++	++++	+++	-	-
LDH-1	+	-	-	-	-
GPT	++	+++	++	++	-
GOT	-	+	+	-	-

Tab. 6: Vergleich der Gallensäurewirkungen,
die Gallensäuren wurden im Tris/HCl-Puffer nach (45) gelöst.
-: keine Wirkung,
+:gibt Intensitätsgrad der Enzyminaktivierung an.

In bezug auf die beiden Isoenzyme LDH-1 und LDH-5 erwies sich DC als stärkster Enzyminhibitor. Sie vermochte, sowohl LDH-5 auf 0 U/l als auch LDH-1 signifikant zu hemmen. DC war als einzige der untersuchten Gallensäuren in der Lage, LDH-1 zu beeinflussen.

LDH-5 wurde von CDC und DC gleich stark (beide bei 0,5 g/l) und in weit geringerer Konzentration als UDC (bei 2,5 g/l) auf 0% (bzw. 3%) der Kontrolle gehemmt, wohingegen TC und DHC keinen Effekt zeigten.

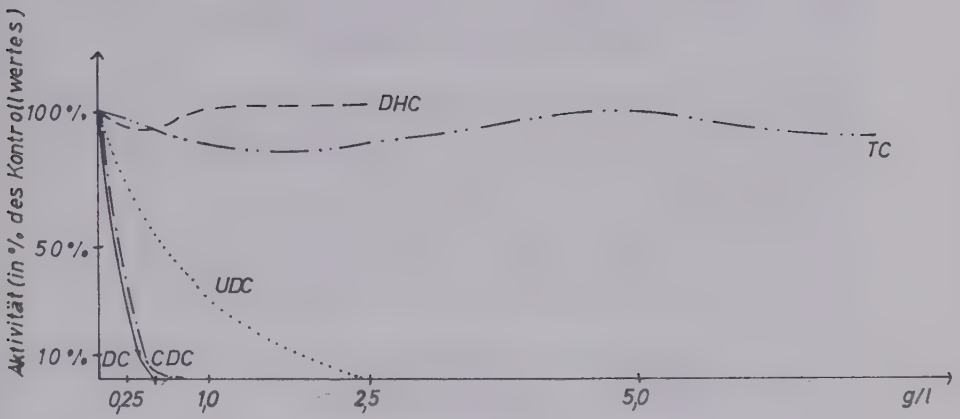


Abb. 18: Vergleich der Gallensäuren in ihrer Wirkung auf LDH-5, konzentrationsabhängige Inaktivierung von LDH-5 (Puffer: Tris/HCl) t=60' (n=2, bei DC n=3) (Absolutwerte±SEM im Anhang)

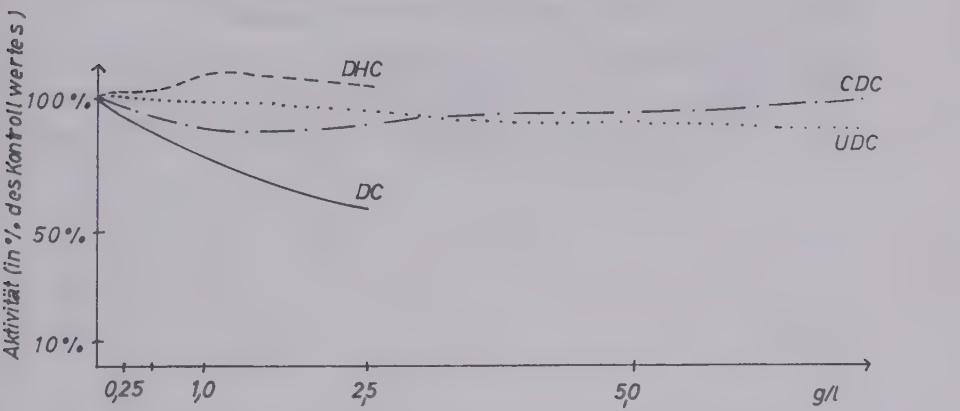


Abb. 19: Vergleich der Gallensäuren in ihrer Wirkung auf LDH-1, konzentrationsabhängige Inaktivierung von LDH-1 (Puffer: Tris/HCl) t=60' (n=2, bei DC n=3) (Absolutwerte±SEM im Anhang)

Die Aktivität von GPT wurde von allen Gallensäuren bis auf DHC in etwa gleichmäßig gehemmt (auf ca. 50% bei 2,5 g/l). Nur CDC führte zu einem geringfügig stärkeren Aktivitätsverlust.

GOT wurde am wenigsten von den Gallensäuren beeinflußt. Lediglich CDC und UDC vermochten, diese Transaminase schwach zu inaktivieren.

Als die am stärksten wirksamen Gallensäuren haben sich also DC und CDC herausgestellt, die schwächste noch wirksame war TC. DHC erwies sich als unwirksam in diesen Versuchen.

5.7. Wirkung der Gallensäuren auf die Hilfsenzyme LDH und MDH der Monotests

Es konnte ausgeschlossen werden, daß der Aktivitätsverlust von GPT auf eine Wechselwirkung der Gallensäuren mit dem Hilfsenzym LDH des Monotests zurückzuführen war, denn ein 100-facher LDH-1-Überschuß im Testansatz erbrachte keine signifikant anderen Ergebnisse.

Eine Inaktivierung des Hilfsenzyms MDH durch die Gallensäuren in den bei der GOT-Bestimmung in der Küvette enthaltenen Konzentrationen und innerhalb der 3-4 minütigen Meßzeit konnte ebenfalls ausgeschlossen werden.

6. DISKUSSION

6.1. Methode der Aktivitätsmessung der mit Gallensäuren inkubierten Enzyme

Wie bereits erwähnt, wurde die Aktivität der Enzyme mittels der jeweiligen Monotests von Boehringer Mannheim bestimmt. Nach je 5, 30 und 60 Minuten wurde aus den Inkubationsansätzen eine Probe entnommen. Dieses Enzym-Gallensäuren-Gemisch wurde dann zu den entsprechenden Testansätzen gegeben.

Man könnte hier einwenden, daß die Gallensäuren dabei eine Wechselwirkung mit den in den Monotests enthaltenen Substanzen eingehen und daß die angenommene Enzyminaktivierung in Wirklichkeit nur eine Beeinträchtigung der Aktivitätsmessung darstellt; z.B. könnten die Gallensäuren möglicherweise das Coenzym $NADH+H^+$ abfangen und damit die Oxydation zu NAD^+ unmöglich machen.

6.1.1. Monotest LDH opt.

Betrachtet man in diesem Zusammenhang zunächst einmal die Bestimmung der beiden Isoenzyme LDH-1 und LDH-5 nach Inkubation mit den oben angegebenen Gallensäuren:

Die Aktivitätsmessung beider Enzyme wurde mittels des gleichen Monotests LDH opt. durchgeführt (Pyruvat + $NADH+H^+$ --- Lactat + NAD^+). Jedoch ergaben sich nach Inkubation mit derselben Gallensäure (z.B. CDC oder UDC) ganz unterschiedliche Ergebnisse in der Hemmbarkeit der beiden Isoenzyme. LDH-5 verlor z.B. nach Einwirkung von CDC und UDC vollständig seine Aktivität, wohingegen sich LDH-1 auch bei der höchsten verwendeten Konzentration von CDC und UDC nicht signifikant vom Kontrollwert unterschied (vgl. 5.1. und 5.3.). Auch bei DC reagierten die beiden Isoenzyme unterschiedlich: Während LDH-5 bei sehr niedriger DC-Konzentration (0,5 g/l) total inaktiviert wurde (Abb. 3), bewirkte DC bei sehr viel höherer Konzentration nur einen schwachen Aktivitätsverlust von LDH-1 (Abb. 11).

Bei gleicher Gallensäure und gleichem Monotest können die unterschiedlichen Ergebnisse also nur auf verschiedene Reaktionen der beiden Isoenzyme LDH-1 und LDH-5 zurückgeführt werden.

Außerdem wurde bei LDH ein zeitabhängiger Hemmechanismus beobachtet. Auch die Tatsache, daß sich je nach Einwirkungsdauer der Gallensäuren auf das Enzym LDH unterschiedliche Ergebnisse zeigten, spricht gegen eine Wechselwirkung zwischen den Gallensäuren und den Substraten im Monotest LDH opt., da die Einwirkungsdauer der Gallensäuren auf den Monotestansatz immer dieselbe war (3-4 Minuten).

6.1.2. Monotest GPT opt.

Die GPT-Aktivität wurde mit Hilfe des Monotests GPT opt. bestimmt:

$$\alpha\text{-Ketoglutarat} + \text{L-Alanin} \xrightarrow{\text{GPT}} \text{L-Glutamat} + \text{Pyruvat}$$

$$\text{Pyruvat} + \text{NADH+H}^+ \xrightarrow{\text{LDH}} \text{L-Lactat} + \text{NAD}^+$$

Eine Wechselwirkung der Gallensäuren mit Pyruvat und $NADH+H^+$ wurde oben bereits ausgeschlossen (6.1.1.). Eine chemische Reaktion zwischen den im Testansatz enthaltenen Substraten (α-Ketoglutarat, L-Alanin, L-Glutamat) und den Gallensäuren ist unter diesen Bedingungen (3 Minuten bei 25°C) ohne Enzymkatalyse unwahrscheinlich.

Außerdem ist α-Ketoglutarat sowohl im Monotest GPT opt. als auch im Monotest GOT opt. enthalten, und da die beiden Enzyme GOT und GPT bei derselben Gallensäure, z.B. DC (vgl. 5.4. und 5.5.), ganz unterschiedlich reagierten - GOT wurde durch DC nicht beeinflußt, während GPT gehemmt wurde - kann diese unterschiedliche Wirkung der Gallensäuren nicht darauf zurückgeführt werden, daß α-Ketoglutarat von diesen abgefangen wird.

Eine direkte Reaktion mit dem Coenzym Pyridoxalphosphat ist ebenso unwahrscheinlich, da auch GOT pyridoxalphosphatabhängig ist und sich jedoch bei derselben Gallensäure anders verhält als GPT (vgl. 5.4. und 5.5.).

Ein Abfangen der Substrate in den Monotests durch die Gallensäuren ist also aus den oben angeführten Gründen unwahrscheinlich.

Um auszuschließen, daß die GPT-Bestimmung durch Inaktivierung des Hilfsenzyms LDH verfälscht wurde, wurden zusätzliche Versuche durchgeführt, in denen das GPT-Gallensäuren-Gemisch zu einem Testansatz gegeben wurde, der einen 100-fachen Überschuß an LDH-1 enthielt.

LDH-1 wurde von allen Gallensäuren bis auf DC nicht signifikant beeinträchtigt und selbst durch DC nur schwach inaktiviert. Bei 100-fachem Überschuß war damit also mit Sicherheit genügend Hilfsenzym vorhanden für die Oxydation von $NADH+H^+$ zu NAD^+. Wenn es sich tatsächlich um eine Verfälschung der Messung durch LDH-Inaktivierung in den vorausgegangenen Versuchen gehandelt hätte, hätte die GPT-Aktivität in diesem Fall 100% der Kontrolle betragen müssen. Es zeigte sich jedoch keine signifikante Veränderung gegenüber den vorhergehenden Messungen ohne LDH-1-Überschuß.

6.1.3. Monotest GOT opt.

$$\alpha\text{-Ketoglutarat} + \text{L-Alanin} \xrightarrow{GOT} \text{L-Glutamat} + \text{Oxalacetat}$$

$$\text{Oxalacetat} + NADH+H^+ \xrightarrow{MDH} \text{L-Malat} + NAD^+$$

Eine Wechselwirkung mit $NADH+H^+$ bzw. Pyridoxalphosphat oder das Abfangen der Substrate im Monotest durch die verwendeten Gallensäuren ist, wie oben bereits erwähnt (vgl. 6.1.2.), unwahrscheinlich. Außerdem konnte in den Vorversuchen ausgeschlossen werden, daß die untersuchten Gallensäuren das Hilfsenzym MDH signifikant inaktivierten.

6.1.4. Zusammenfassung

Der beobachtete Aktivitätsabfall der Enzyme LDH-1, LDH-5, GOT und GPT bei Inkubation mit den Gallensäuren DC, CDC, UDC, TC und DHC scheint also auf eine direkte Wechselwirkung zwischen den Enzymen und den Gallensäuren zurückzufüh-

ren zu sein.

6.2. Wechselwirkung der Gallensäuren mit LDH

6.2.1. LDH (LDH-1 und LDH-5) und Desoxycholsäure

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Lehnert et al. (45) vermochte DC, in 1,0 mM EDTA/2,5 mM Tris/HCl-Puffer (pH=7,5) gelöst, das Isoenzym LDH-5 bei einer Konzentration von 0,5 g/l vollständig in seiner Aktivität zu hemmen. Der ausbleibende Aktivitätsabfall von LDH-1 in der Arbeit von Lehnert et al. konnte jedoch nicht bestätigt werden. Es fand sich nämlich bei den hier beschriebenen Versuchen ein signifikanter, wenn auch nicht so starker Aktivitätsverlust wie bei LDH-5, und zwar eine Hemmung auf 60% der Kontrolle bei 2,5 g/l DC (vgl. 5.3.). Eine speziesbedingte unterschiedliche Empfindlichkeit von LDH-1 kann hierbei ausgeschlossen werden, da wie in der Arbeit von Lehnert et al. (45) die aus Schweineherz isolierte LDH-1 von Boehringer Mannheim verwendet wurde (vgl. 3.).

Diese sich scheinbar widersprechenden Ergebnisse lassen sich möglicherweise dadurch erklären, daß bei gleicher Gallensäurekonzentration im Inkubationsansatz die Anfangsaktivität von LDH-1 in den Versuchen der vorliegenden Arbeit niedriger gewählt war (500 U/l =14 mg/l Protein gegenüber 25 mg/l Protein bei Lehnert et al.). Daraus könnte man folgern, daß LDH-1 zwar weniger Wechselwirkungen mit DC eingeht als LDH-5, aber immerhin nicht ganz unbeeinflußt bleibt, wenn man das Verhältnis DC : LDH-1 hoch genug wählt.

In diesem Sinne kann man auch die Ergebnisse der Elektrophoreseversuche von Lehnert et al. interpretieren, in denen sie eine erhöhte Mobilität von LDH-1 zur Anode beobachteten. Folgerichtig erklärten sie dieses Phänomen durch eine Erhöhung der negativen Ladung des Enzymmoleküls auf Grund der DC-Bindung an LDH-1. In ihrer Diskussion gehen

sie auf diese Beobachtung jedoch nicht weiter ein.

Wahrscheinlich handelt es sich bei der Bindung von DC an LDH um hydrophobe Wechselwirkungen zwischen dem Steroidkern (den Ringen A, B, C, D) des Gallensäuremonomers und apolaren Bezirken des Enzyms. Dadurch sind auch die Unterschiede in der Hemmbarkeit von LDH-1 und LDH-5 zu erklären. LDH-5 besitzt nämlich durch seine Aminosäuresequenz einen weitaus hydrophoberen Charakter als LDH-1 (vgl. 2.1.1.). Außerdem ist anzunehmen, daß es bei Proteinen mit ausgeprägten hydrophoben Molekülbezirken durch hydrophobe Interaktionen mit Gallensäuren wahrscheinlich eher zu einer Konformationsänderung (und damit zur Inaktivierung) kommt als bei stark hydrophilen Proteinen.

Lehnert et al. halten es für möglich, daß eine leichte Konformationsänderung der Untereinheit M bereits ausreicht, um das aktive Zentrum zu beeinträchtigen. Dieser Effekt könnte ihrer Meinung nach durch die gegenseitige Abstoßung der geladenen Gruppen von DC verstärkt werden. Dadurch würden benachbarte hydrophobe Segmente der Untereinheit M auseinandergedrängt. Eine spezifischere Reaktion mit dem aktiven Zentrum halten sie für unwahrscheinlich.

Wenn man sich die LDH-Struktur, soweit sie heute bereits bekannt ist, vor Augen führt (vgl. 2.1.1.), könnte man aber auch folgende Überlegung anstellen: Da nach Bindung des Coenzyms an LDH in der Umgebung des Nicotinamidringes hydrophobe Bezirke auftauchen, wäre es denkbar, daß sich DC u.a. auch an diese Bezirke heftet. Dadurch könnten das DC-Molekül bzw. die DC-Moleküle z.B. die anschließende Substratbindung an das aktive Zentrum behindern oder auch die Wechselwirkung zwischen $NADH+H^+$ und Pyruvat stören. Die Tatsache, daß LDH-1 weniger stark in seiner Aktivität beeinträchtigt wird, kann möglicherweise auch darauf zurückzuführen sein, daß die Umgebung des aktiven Zentrums der LDH-1 weniger hydrophobe Elemente aufweist als die der LDH-5.

Andererseits könnte die Hemmung der Enzymaktivität einfach darauf beruhen, daß die gebundene Gallensäure die sich wäh-

rend der Katalyse vollziehende Konformationsänderung (vgl. 2.1.1.) behindert und somit die Funktion des aktiven Zentrums stört. Die Gallensäure müßte sich dabei nicht unbedingt in der unmittelbaren Umgebung des aktiven Zentrums befinden.

Möglicherweise könnte man mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse nähere Informationen über die Wechselwirkung bzw. Art und Lokalisation der Bindung zwischen DC und LDH gewinnen.

Die Beobachtung von Lehnert et al. (45) eines eher plötzlichen als allmählichen Aktivitätsabfalls von LDH-5 (von ca. 90% auf 15% beim Übergang von 0,25 g/l auf 0,5 g/l) konnte, wie oben bereits angedeutet, ebenfalls nicht bestätigt werden. Denn in diesen Versuchen zeigte sich bereits bei der niedrigsten verwendeten Konzentration von 0,25 g/l eine Inaktivierung auf 28% der Kontrolle. Eventuell ist dies auch damit zu erklären, daß die hier gewählte Anfangsaktivität geringer war (500 U/l = 10 mg/l Protein gegenüber 25 mg/l Protein bei (45)). Andererseits sind Lehnert et al. aber auch nicht in der Lage, dieses Phänomen eindeutig zu erklären. Denn es ist nicht ohne weiteres einsehbar, warum DC nach dem Alles-oder-Nichts-Prinzip entweder auf alle Enzyme bzw. Enzymuntereinheiten oder überhaupt nicht hemmend wirken sollte. Wenn DC das Enzym durch seine hydrophobe Bindung an bestimmte Abschnitte des Moleküls hemmt, dann ist es denkbar, daß bei niedriger Konzentration nur wenige Untereinheiten betroffen sind und daß bei steigender Konzentration immer mehr Untereinheiten ihre Aktivität verlieren, was dem eher allmählichen Aktivitätsabfall in dieser Arbeit entspräche.

Zeitabhängiger Inaktivierungsverlauf:

Wie in der graphischen Darstellung in Abhängigkeit von der Zeit (Abb. 5,7,12) abzulesen ist, bedarf es für die Ausbildung des vollen Effektes sowohl bei LDH-5 als auch bei LDH-1 einer Inkubationszeit von mindestens 30 bis 60 Minuten. Auch Lehnert et al. (45) weisen in ihrer Arbeit auf diesen Zeitverlauf der Inaktivierung hin. Dieser Effekt könnte da-

durch erklärt werden, daß durch die Anlagerung eines Gallensäuremoleküls an das Enzym die weitere Gallensäureanlagerung an benachbarte Untereinheiten durch gegenseitige Beeinflussung der Gallensäuremoleküle (Abstoßung der geladenen Gruppen) verzögert wird. Dabei wird von der Voraussetzung ausgegangen, daß durch die Bindung von einem oder mehreren Gallensäuremolekülen an eine Untereinheit des Enzyms die Aktivität der anderen Untereinheiten nicht beeinträchtigt wird.

Dissoziation von LDH:

Lehnert et al. halten eine Dissoziation von LDH, wie sie bei Einwirkung von Na-Dodecylsulfat beobachtet wird, als Ursache für die Aktivitätshemmung durch DC für unwahrscheinlich, da eine Restaktivität bei den Heterotetrameren in ihrer Arbeit (45) zu beobachten war, die prozentual dem H-Anteil entsprach, und da sie davon ausgehen, daß weder Monomere noch Dimere von LDH aktiv seien. Dieser Ausschluß einer Dissoziation von LDH widerspricht jedoch ihren Beobachtungen in der elektrophoretischen Isoenzymstudie (45): Nach Inkubation eines Isoenzymgemisches (LDH-1,...,LDH-5) mit DC fanden sie nämlich bei 5,0 g/l eine Zunahme der LDH-1-Bande um ca. 60% bezogen auf 1,0 g/l, worauf sie jedoch nicht näher eingingen.

Diese Zunahme könnte durch folgende Überlegung zu erklären sein: Die Untereinheit M bietet möglicherweise auf Grund ihrer stärkeren Hydrophobizität für die Dissoziation des Tetramers durch DC einen besseren Angriffspunkt als H. LDH-5 würde demnach am leichtesten dissoziieren, und die Heterotetramere ließen sich mit zunehmendem H-Anteil folglich immer schwerer dissoziieren. Dies erklärt die von Lehnert et al. beobachtete schwache Restbande der Heterotetramere. Die Intensitätszunahme der LDH-1-Bande bei steigender DC-Konzentration wäre somit dadurch zu erklären, daß sich die aus den zerlegten Heterotetrameren stammenden H-Untereinheiten zum relativ stabilen H_4-Isoenzym wiedervereinigen

und folglich die LDH-1-Bande verstärken.

Die Dissoziation des LDH-Tetramers müßte dabei jedoch nicht direkt die Ursache der Enzyminaktivierung darstellen, zumal die Meinungen bezüglich der katalytischen Fähigkeit der Monomere derzeit noch nicht einheitlich sind (vgl. 2.1.1.).

6.2.2. Auswirkung der verschiedenen Pufferlösungen auf die Desoxycholsäure-Wirkung bei LDH-5

Interessanterweise zeigte sich bei Lösung von DC im Standardmedium (Tab. 7, pH=7,5) eine signifikante Verschiebung der Inaktivierungskurve von LDH-5 nach rechts, d.h. zu höheren Konzentrationen (Abb. 9). DC vermochte nämlich im Medium erst in 5-fach höherer Konzentration (bei 2,5 g/l) als im Tris-Puffer, LDH-5 in gleicher Weise zu inaktivieren. Folgende Überlegungen könnten zur Aufklärung dieses Phänomens beitragen:

Bei Zunahme der Ionenstärke im Medium wird die kritische Mizellenkonzentration für DC gesenkt (31,55). Jedoch nur die freien DC-Moleküle und nicht die Mizellen sind in der Lage, mit Protein zu reagieren (45). Bei gleicher DC-Konzentration liegen im Medium (Ionenstärke ca. 0,21) somit weniger freie DC-Moleküle als im Tris-Puffer nach Lehnert et al. (Ionenstärke 0,007) vor. Bei DC erfolgt im Gegensatz zu anderen mizellenbildenden Lipiden bei Konzentrationssteigerung oberhalb der CMC noch eine Zunahme der Monomere (vgl. 2.2.6.). Folglich werden im Medium die freien DC-Moleküle erst bei höherer DC-Konzentration die für die Inaktivierung erforderliche Konzentration erreichen.

Außerdem ist das Medium auf Grund seiner hohen Ionenstärke in der Lage, elektrostatische Interaktionen zu reduzieren (31), was für eine Beteiligung der geladenen Gruppen von DC an der Inaktivierung spricht.

Ein weiterer Versuch, bei dem DC im Standardmedium zusammen mit Albumin in ca. halbphysiologischer Konzentration (2,6

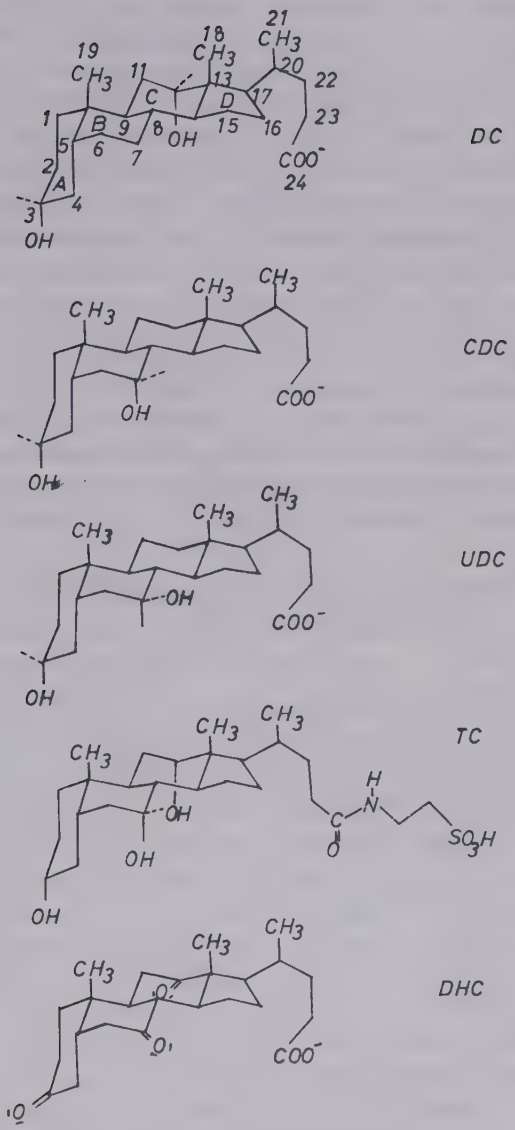


Abb. 20: Perspektivische Darstellung der verwendeten Gallensäuren

g%) verwendet wurde, zeigte, daß auch eine sechsfach höhere Konzentration (3,0 g/l) von DC (Abb. 10, Tab. 14) nicht ausreichte, um das Enzym LDH-5 zu beeinflussen, nicht einmal nach einer Inkubationszeit von ca. 2,5 Stunden. Da freie DC sich nach (51) an Albumin binden kann, besteht dieser schützende Effekt wahrscheinlich im Abfangen der freien DC durch Albumin. Obwohl es sich im Vergleich zu den Membranproteinen oder Apo-LDL um ein relativ hydrophiles Protein handelt (31), scheint seine Affinität zu DC höher zu sein als die der LDH zu DC.

Die Aufhebung der Inaktivierung von LDH-5 durch DC konnte bei nachträglicher Zugabe von Albumin innerhalb der Versuchszeit von 30 Minuten nicht beobachtet werden. Dies spricht entweder für eine irreversible Inaktivierung durch DC oder für eine extrem lange Einstellungsdauer des Gleichgewichtes zwischen DC und Albumin.

Standardmedium	Tris/HCl-Puffer
pro 1 l Aqua bidest.:	
122 mM NaCl	2,5 mM Tris/HCl
5,36 mM KCl	1,0 mM EDTA
0,4 mM $MgSO_4 \times 7H_2O$	Ionenstärke 0,007
0,5 mM $MgCl_2 \times 6H_2O$	pH=7,5
0,34 mM $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$	
0,44 mM $KHPO_4$	
1,0 mM $CaCl_2$	
5,05 mM Glucose x H_2O	
22,5 mM $NaHCO_3$	
Ionenstärke 0,21	
pH=7,5 (mit 1n HCl eingestellt)	

Tab. 7: Verwendete Pufferlösungen

6.2.3. LDH (LDH-1 und LDH-5) und Cheno- bzw. Ursodesoxycholsäure

Beim Strukturvergleich von CDC und UDC mit DC fällt auf, daß sich diese Gallensäuren kaum voneinander unterscheiden (Abb. 20). Die AB cis-, BC trans-, CD trans- Stellung der Ringe, die α-3-OH-Gruppe, das Vorhandensein zweier OH-Gruppen insgesamt, sowie die Seitenkette sind in allen drei Gallensäuren identisch. Lediglich in der Lokalisation der zweiten OH-Gruppe unterscheiden sie sich: Während sich diese beim DC-Molekül am C_{12}-Atom befindet, ist sie bei CDC und UDC am C_7-Atom lokalisiert.

Neben dieser sehr ähnlichen Struktur ist allen drei Gallensäuren das Inaktivierungsmuster der Isoenzyme LDH-1 und LDH-5 gemeinsam: LDH-5 verliert in allen Fällen seine Aktivität vollständig, dagegen bleibt LDH-1 mehr oder weniger unbeeinflußt (schwache Hemmung durch DC).

Es liegt daher nahe anzunehmen, daß es sich bei CDC und UDC um den gleichen Inaktivierungsmechanismus wie bei DC infolge hydrophober Wechselwirkung handelt.

Die im Vergleich zu CDC weitaus geringere Effektivität von UDC bei der Inaktivierung von LDH-5 (vgl. Abb. 4,6) kann dabei nur auf den einzigen Unterschied dieser beiden Gallensäuren zurückgeführt werden, nämlich die Stellung der OH-Gruppe am C_7-Atom: Während diese Hydroxylgruppe bei der CDC in α-Stellung am C_7-Atom gebunden ist, d.h. vom unpolaren Ringsystem der Ringe B-C-D wegweist, befindet sich diese bei der UDC in B-Stellung. Durch die cis- bzw. B-Orientierung liegt diese OH-Gruppe also in der Ebene des Ringsystems B-C-D und verringert möglicherweise durch ihre Polarität die Fähigkeit zu hydrophoben Wechselwirkungen. Die daraus resultierende geringere Tendenz von UDC, sich an die hydrophoben Bezirke der LDH zu binden, könnte daher der Grund dafür sein, daß UDC erst bei höherer Konzentration eine mit CDC oder DC vergleichbare Wirkung zeigt. LDH-1 wurde weder durch CDC noch durch UDC inaktiviert. Dies dürf-

te wohl darauf zurückzuführen sein, daß LDH-1 weniger hydrophobe Bezirke aufweist als LDH-5 (vgl. 2.1.1.) und daß CDC und UDC im Vergleich zu DC einen schwächeren hydrophoben Charakter besitzen (vgl. 2.2.6.).

Zeitlicher Inaktivierungsverlauf:

Der Verlauf der Inaktivierung von LDH-5 durch CDC und UDC in Abhängigkeit von der Zeit ist mit dem bei der Inkubation mit DC vergleichbar und legt den Schluß nahe, daß es sich um eine spezifische Eigenschaft des Enzyms handelt. Dies bestätigt wiederum die Annahme, daß möglicherweise der Aufbau des Enzyms aus vier Untereinheiten eine Rolle im Ablauf der Inaktivierung spielt.

6.2.4. LDH (LDH-1 und LDH-5) und Tauro- bzw. Dehydrocholsäure

Obwohl diese Gallensäuren starke strukturelle Unterschiede aufweisen, liegt es nahe, sie in ihrer Wirkung auf LDH zusammen zu besprechen: Denn interessanterweise fand sich bei beiden weder eine Wirkung auf LDH-5 noch auf LDH-1. Beiden gemeinsam ist außerdem die Reduktion ihrer Hydrophobizität durch Veränderungen am Cholestangerüst bzw. an der Seitenkette:

Das bei den drei vorher besprochenen Gallensäuren (CDC, UDC, DC) relativ apolare Ringsystem der Ringe B-C-D erhält durch die beiden Ketogruppen am C_7- und C_{12}-Atom von DHC polaren Charakter.

Durch säureamidartiges Anfügen von Taurin an die Cholsäureseitenkette wird diese zum einen stärker polarisiert (33), zum anderen wird das gesamte Molekül dadurch sperriger. Außerdem könnte das gleichzeitige Auftreten von Hydroxylgruppen am C_7- und C_{12}-Atom infolge von Wechselwirkungen dieser Gruppen untereinander den apolaren Charakter der Ringe B-C-D herabsetzen. Dafür spricht, daß sich Cholsäure in einem vergleichenden Versuch (nicht veröffentlicht) in seiner hemmenden Wirkung auf LDH-5 als weitaus weniger

wirksam erwies als CDC, UDC und DC (bei 10,0 g/l Inaktivierung von LDH-5 auf ca. 30%, LDH-1 unbeeinflußt).

Aus diesem Grunde ist die Tendenz von DHC und TC, sich an hydrophobe Bezirke des Enzyms zu heften, viel geringer als bei den drei vorher besprochenen Gallensäuren, was wiederum die Annahme bestätigt, daß hydrophobe Kräfte eine entscheidende Rolle bei der Inaktivierung von LDH spielen.

6.3. Wechselwirkungen der Gallensäuren mit GPT

GPT zeigte nach Inkubation mit den Gallensäuren ein ganz anderes Bild der Inaktivierung als LDH. Es wurde zwar in Abhängigkeit von der Konzentration ein zunehmender Aktivitätsverlust, aber nie eine vollständige Inaktivierung festgestellt. Im Gegensatz zu LDH spielte die Dauer der Inkubation dabei keine Rolle. Bereits initial, d.h. nach fünf Minuten, war nämlich der für die jeweilige Gallensäurekonzentration charakteristische Aktivitätsabfall vollständig ausgebildet. Außerdem zeigte sich abweichend von LDH, daß, mit Ausnahme von DHC, alle anderen verwendeten Gallensäuren GPT in nahezu gleicher Weise und Intensität zu inaktivieren vermochten.

Die im Gegensatz zu LDH initiale Hemmung könnte darauf beruhen, daß sich GPT nicht wie LDH aus mehreren Untereinheiten zusammensetzt.

Inaktivierungsmechanismus:

Da sich GPT also ganz anders verhielt als LDH, ist anzunehmen, daß der Inaktivierungsmechanismus sich ebenfalls grundsätzlich von dem bei LDH unterscheidet. Obwohl sich die Gallensäuren, wie oben gezeigt wurde, beträchtlich in ihrer hydrophoben Natur unterscheiden, sind sie in der Lage, das Enzym GPT in annähernd gleichem Ausmaß zu hemmen. Dies läßt darauf schließen, daß hydrophobe Wechselwirkungen hier allenfalls eine untergeordnete Rolle spielen.

Möglicherweise sind die Hydroxylgruppen der Gallensäuren an der Reaktion mit der Transaminase beteiligt, da DHC als

einzige nicht wirksame Gallensäure (Tab. 17) auch keine OH-Gruppen an seinem Molekül trägt (stattdessen drei Ketogruppen). Auch das Abfangen von Metallionen, die für die Transaminierung wichtig sein sollen, durch die Gallensäuren könnte mit zur Aktivitätshemmung von GPT beitragen.

6.4. Wechselwirkung der Gallensäuren mit GOT

Im Vergleich zu GPT und LDH-5 erwies sich GOT gegenüber den untersuchten Gallensäuren als sehr stabil. Nur die beiden Gallensäuren CDC und UDC vermochten überhaupt eine Wirkung zu erzielen. Allerdings war auch hier der beobachtete Aktivitätsabfall zwar signifikant, aber relativ schwach (vgl. Abb. 16,17).

Inaktivierungsmechanismus:

Da DC das Enzym nicht beeinflussen konnte, ist anzunehmen, daß auch in diesem Fall der Inaktivierungsmechanismus primär nicht auf einer hydrophoben Wechselwirkung beruht. Das Abfangen von für die Transaminierung erforderlichen Metallionen könnte möglicherweise auch eine Rolle spielen.

Zeitlicher Inaktivierungsverlauf:

Die auch hier wie bei GPT beobachtete initiale Inaktivierung kann zum einen durch den im Vergleich zu LDH anders gearteten Hemmechanismus bedingt sein. Zum anderen beruht dieses Phänomen möglicherweise darauf, daß GOT aus nur einer Peptidkette besteht und nicht wie LDH aus mehreren Untereinheiten zusammengesetzt ist.

6.5. Wirkungsmechanismus bei der Inaktivierung von LDH, GOT und GPT

Das Inaktivierungsmuster von LDH (LDH-1 und LDH-5) legt den Schluß nahe, daß hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Enzym und Gallensäure für den Aktivitätsverlust des Enzyms entscheidend sind. Denn zum einen stimmt die Abstufung der Hydrophobizität (DC>CDC>UDC>TC>DHC) mit der Abstufung der

Inaktivierungsintensität der Gallensäuren überein, d.h. daß die Gallensäure mit der stärksten hydrophoben Natur (DC) LDH am stärksten zu inaktivieren vermochte, während die schwächste hydrophob wirkende Gallensäure (DHC) keine Wirkung mehr zeigte.

Zum anderen wurde das im Vergleich zu LDH-5 mit weniger hydrophoben Bezirken ausgestattete Enzym LDH-1 auch weniger durch die verwendeten Gallensäuren beeinflußt. Lediglich DC vermochte LDH-1 leicht zu inaktivieren.

Ob die Gallensäuren dabei einen spezifischen Angriffspunkt am aktiven Zentrum besitzen, oder ob es sich um eine unspezifische Konformationsänderung des gesamten Enzyms handelt, kann in diesem Rahmen nicht beantwortet werden.

Die Inaktivierung der LDH (LDH-1 und LDH-5) zeigte im Gegensatz zu GOT und GPT einen zeitabhängigen Verlauf. Da dieses Phänomen unabhängig von der jeweils verwendeten Gallensäure beobachtet wurde, scheint es sich um eine Eigenart der LDH zu handeln. Möglicherweise werden die Untereinheiten nacheinander durch die Gallensäuren inaktiviert, wobei nach Bindung der Gallensäure an eine Untereinheit die nachfolgende Bindung von Gallensäuremonomeren an benachbarte Untereinheiten durch gegenseitige Abstoßung der geladenen Gruppen erschwert wird.

Demgegenüber wurde bei den aus nur einer Peptidkette bestehenden Transaminasen GOT und GPT eine initiale Inaktivierung beobachtet. Andererseits könnte der von der LDH-Inaktivierung abweichende zeitliche Verlauf der Aktivitätshemmung auch auf einen anderen Inaktivierungsmechanismus zurückzuführen sein, denn GPT wurde von allen Gallensäuren etwa gleich stark gehemmt, obwohl sich diese, wie unter 2. 2.6. näher ausgeführt, in ihrer hydrophoben Natur unterscheiden. Da bei einer Konformationsänderung infolge hydrophober Kräfte neben den Liganden (Gallensäuren) auch die Größe und Intensität der apolaren Bezirke des jeweiligen Proteins entscheidend sind, könnte man daraus folgern, daß GPT nur wenig ausgeprägte hydrophobe Bezirke besitzt, oder

aber diese sind für die Gallensäure nicht erreichbar.

GOT wird wahrscheinlich ebenfalls nicht durch hydrophobe Interaktionen in seiner Aktivität beeinflußt, da sich nur bei CDC und UDC in diesen Versuchen ein Effekt zeigte. DC vermochte dagegen GOT nicht zu beeinflussen. Möglicherweise ist dies, wie auch bei GPT, in der Struktur des Enzyms (nur wenige oder schwache hydrophobe Bezirke) begründet.

Bei den beiden zuletzt genannten Enzymen könnten die OH-Gruppen der Gallensäuren möglicherweise eine Rolle bei der Inaktivierung spielen, da die Triketosäure DHC keine Wirkung zeigte.

6.6. Rolle der Gallensäuren in der Diagnostik von Serumenzymen

6.6.1. Enzymdiagnostik bei Lebererkrankungen

Bei Lebererkrankungen kommt es infolge von Zellschäden zum Austritt von Zellenzymen ins Blut, und zwar bereits zu einem Zeitpunkt, zu dem noch keine Veränderungen an der Zellmembran licht- oder elektronenmikroskopisch erkennbar sind (77). Die Diagnose von Leberzellenzymen im Serum ist also ein subtiler Nachweis für Leberzellschäden. Zudem handelt es sich um unkomplizierte und schnell durchführbare Tests, so daß Enzymaktivitätsbestimmungen im Serum für die Diagnose und Verlaufsbeobachtung von Lebererkrankungen unentbehrlich sind.

In der Leberdiagnostik haben sich u.a. die Enzymbestimmungen von GOT und GPT im Serum bewährt (neben γ-GT, AP, GLDH, CHE) (76). Die Bestimmung von LDH-1 spielt bei Lebererkrankungen keine Rolle, da der LDH-1-Gehalt der Leber zu gering ist (75), um einen signifikanten Anstieg im Serum zu verursachen (0,2% LDH-1 gegenüber 94% LDH-5 beim Menschen (67)). Das leberspezifische Isoenzym LDH-5 weist mit 10 ± 2 Stunden (76) eine sehr kurze Halbwertszeit auf, so daß i.a. auch auf die Bestimmung von LDH-5 in der Leberdiagnostik verzichtet wird.

Bei bestimmten Lebererkrankungen (akute Hepatitis, extrahepatische Cholestase) kann die Gesamtgallensäurekonzentration im Serum auf fast das 100-fache des Normalwertes von 0,95 mg/l ansteigen: bei extrahepatischer Cholestase bis auf 37 mg/l und bei akuter Hepatitis bis auf 48 mg/l (50).

Dies wirft die Frage auf, ob der Anstieg der Gallensäuren im Serum zu einer Beeinträchtigung der Aktivität von Serumenzymen (z.B. GOT, GPT) und damit zu einer Verfälschung der Leberdiagnostik führen kann.

Dagegen sprechen folgende Überlegungen:
GPT wurde in den Versuchen dieser Arbeit selbst bei einer 5-fach höheren Konzentration (250 mg/l) der im Tris/HCl-Puffer (Tab. 7) gelösten Gallensäuren (DC, CDC, UDC, TC, DHC) noch nicht signifikant in seiner Aktivität beeinträchtigt.

GOT erwies sich als noch stabiler, da nur CDC und UDC in einer 50-fach höheren Konzentration (2,5 g/l) das Enzym schwach (auf 80-90% der Kontrolle) zu inaktivieren vermochten.

Im Serum oder im Standardmedium (Tab. 7), dessen Ionenstärke mit der des Serums vergleichbar ist, kommt es außerdem infolge der Senkung der CMC (critical micelle concentration) (31,55) zu einer Reduktion des freien Gallensäureanteils, der wahrscheinlich für die Inaktivierung der Enzyme verantwortlich ist.

Zudem muß berücksichtigt werden, daß es sich bei der hohen Gallensäurekonzentration im Serum von an Hepatitis oder Cholestase erkrankten Patienten (bis 48 mg/l) um ein Gallensäurengemisch handelt, das vorwiegend aus konjugierten Gallensäuren besteht, wobei TC den Hauptteil ausmacht (50). Diese können untereinander und mit anderen im Blut enthaltenen Bestandteilen gemischte Mizellen bilden. Auf Grund der hohen Affinität der Gallensäuren zu lipophilen Substanzen (13, 21, 31) nämlich werden die Gallensäuren wahrschein-

lich vorwiegend mit Serumlipiden (Cholesterin, Phospholipiden, Fettsäuren) reagieren, so daß sie für eine Enzyminaktivierung nicht mehr zur Verfügung stehen.

Auch die seltener durchgeführte Bestimmung der Serum-LDH-5 dürfte bei Lebererkrankungen mit einem Gallensäureanstieg im Serum nicht beeinträchtigt werden:

Die Gallensäure, die in diesen Versuchen LDH-5 (neben CDC) am stärksten zu inaktivieren vermochte, nämlich DC, war bei Lösung im Standardmedium mit Albumin selbst in einer Konzentration von 3000 mg/l nicht mehr fähig, LDH-5 zu inaktivieren (vgl. 5.2. und 6.2.2.). Albumin ist nämlich in der Lage, freie DC und wahrscheinlich auch andere Gallensäuremonomere hydrophob zu binden (51).

Ob auch andere als die in dieser Arbeit untersuchten Enzyme (LDH-1, LDH-5, GOT, GPT) durch die erhöhte Gallensäurekonzentration (48 mg/l) bei akuter Hepatitis oder Cholestase inaktiviert werden, ist in diesem Rahmen nicht zu beantworten.

6.6.2. Desoxycholsäure als Hilfsmittel in der Diagnostik der Serum-LDH

In ihrer Arbeit stellten Lehnert et al. (45) in Aussicht, DC zukünftig möglicherweise als ein nützliches Hilfsmittel in der klinischen Chemie zu benutzen, um den Prozentsatz der Untereinheiten M und H der Serum-LDH spektrophotometrisch zu bestimmen, da LDH-1 (H_4) in ihren Experimenten nach DC-Einwirkung völlig unbeeinflußt blieb, während LDH-5 (M_4) inaktiviert wurde. Dem ist entgegenzuhalten, daß Serum-Albumin freie DC zu binden vermag (51) und auch, daß DC in einer relativ hohen Konzentration (3 g/l) bei Zugabe von Albumin (26 g/l) nicht mehr in der Lage war, LDH-5 signifikant zu inaktivieren. Außerdem besitzt DC, wie oben bereits erwähnt, eine hohe Affinität zu Serumlipiden (13,21, 31). Es ist also nicht zu erwarten, daß eine Zugabe von DC zum Serum zu einer Inaktivierung von LDH-5 (M_4) (oder LDH-4, LDH-3 ...) führen, d.h. eine Unterscheidung von H- bzw.

M-Unterheiten der Serum-LDH ermöglichen wird.

Auch eine Steigerung der DC-Konzentration über 3 g/l hinaus würde wahrscheinlich nicht zu einer Inaktivierung von LDH-5 führen, da Konzentrationserhöhungen oberhalb der CMC neben einer leichten Zunahme der Monomere (51), die wahrscheinlich durch Albumin und Lipide abgefangen werden, vornehmlich in einer ausgeprägten Bildung primärer und sekundärer Mizellen resultieren. Mizellen nehmen jedoch an der Wechselwirkung mit Proteinen nicht teil (51).

Die Möglichkeit, DC als Diagnostikum für LDH zu benutzen, besteht demnach wahrscheinlich nicht.

6.7. Cholesteringallensteintherapie mit CDC und UDC

Seit einigen Jahren wird den beiden Dihydroxygallensäuren CDC und UDC in der Gastroenterologie besondere Aufmerksamkeit geschenkt, da sie nach oraler Verabreichung Cholesteringallensteine aufzulösen vermögen (1,2,15,38,42,52,62,73, 83,88). Untersuchungen bezüglich des Wirkungsmechanismus ergaben, daß diese Gallensäuren das geschwindigkeitsbestimmende Enzym der Cholesterinsynthese, die HMG-CoA-Reduktase, in der Leber in seiner Aktivität reduzieren. Infolgedessen kommt es zur Cholesterinuntersättigung der Galle, und auskristallisiertes Cholesterin kann dadurch allmählich wieder in Lösung gehen (54,79). UDC soll dabei bei gleicher Dosierung wie CDC (13-18 mg/(die x kg)) den Cholesteringehalt der Galle signifikant stärker senken als CDC (85). Außerdem wurden Nebenwirkungen, wie sie bei der CDC-Therapie auftreten, z.B. Transaminasenanstieg im Serum, Diarrhoe, nach Gabe von UDC in klinischen Studien nicht beobachtet (46,85).

Auch andere Untersuchungen bezüglich der Hepatotoxizität von CDC und UDC (23,24,47,59.84,91) kamen einheitlich zu dem Ergebnis, daß CDC in weit stärkerem Ausmaß toxisch wirkt als UDC. Nach oraler Gabe bzw. Perfusion verursachte CDC erhebliche morphologische Veränderungen in der Leber (Dilatation der Canaliculi, Mikrovillischwund, fragmentier-

tes ER, pyknotischer Zellkern, einzelne Zellnekrosen,...), und nach oraler Gabe von 1000 mg/(die x kg) an Ratten verstarben diese nach wenigen Tagen (47). UDC dagegen verursachte selbst in hohen Dosen keine morphologischen Veränderungen im Leberparenchym (23,47,84).

Viele Autoren führen diese unterschiedliche Hepatotoxizität auf den unterschiedlichen Metabolismus von CDC und UDC zurück (23,47):

CDC wird nämlich im Gegensatz zu UDC im Darm bakteriell zur stark hepatotoxischen Lithocholsäure (LC) abgebaut.

Da UDC sich, wahrscheinlich auf Grund seiner geringeren Hydrophobizität, in dieser Arbeit als weit weniger wirksam in der Inaktivierung von LDH-5 als CDC erwiesen hat, scheinen die beobachteten Unterschiede der beiden Gallensäuren nicht nur auf einem unterschiedlichen Metabolismus zu beruhen. Möglicherweise ist CDC auf Grund seines stärker ausgeprägten hydrophoben Charakters (vgl. 2.2.6.) in stärkerem Ausmaß als UDC in der Lage, mit lipophilen Membranbestandteilen zu reagieren und somit die Zellen zu schädigen.

Dies steht in Übereinstimmung mit Leberperfusionsversuchen (59,72), in denen der Abbau von CDC (im Darm!) zu LC mit Sicherheit ausgeschlossen werden konnte. Auch hier fand sich eine signifikant stärkere Toxizität von CDC.

Dies legt den Schluß nahe, daß UDC in der Therapie von Cholesteringallensteinen ihrem 7-α-Epimer CDC vorgezogen werden sollte.

Vielleicht sollte versucht werden, mit Taurin oder Glycin konjugierte UDC therapeutisch zu verwenden; denn konjugierte Gallensäuren werden z.T. in konjugierter Form resorbiert (74) und durch die Konjugierung erhält UDC einen stärkeren hydrophilen Charakter und ist somit wahrscheinlich noch weniger hepatotoxisch. Außerdem wird der Leber dadurch z.T. die Arbeit der Konjugation abgenommen.

6.8. Ist eine Enzyminaktivierung in vivo möglich

Der Tatsache, daß die Gallensäuren bei höherer Ionenkonzentration Mizellen bilden und daß sie die Tendenz zeigen, mit apolaren Substanzen (Lipide oder lipophile Proteine) zu reagieren, muß man bei der Übertragung der Ergebnisse aus den in vitro Versuchen auf die Verhältnisse in vivo Rechnung tragen.

Da Albumin bereits in halbphysiologischer Konzentration die Hemmwirkung von DC auf LDH-5 zu verhindern vermochte und da die Zelle neben weitaus lipophileren Proteinen als Albumin (31) mit großen Lipidmengen ausgestattet ist, kann man annehmen, daß der inaktivierende Effekt der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Gallensäuren auf die Enzyme LDH-1, LDH-5, GOT und GPT in vivo, z.B. bei Cholestase, allenfalls eine untergeordnete Rolle spielt. Zellipide, die eine viel stärkere Affinität zu DC besitzen als Albumin oder LDH (13, 21, 70) werden die Gallensäuren wahrscheinlich abfangen und mit diesen gemischte Mizellen bilden. Folglich ist zu erwarten, daß die Zelle bereits in anderen Systemen empfindlich gestört sein wird, bevor man eine Inaktivierung der LDH-5, GOT oder GPT beobachten kann. Bei genauerem Studium der Literatur scheint dies bestätigt zu werden:

Nach Leberperfusionen mit Gallensäuren (z.B. CDC) wurden nämlich bereits bei 1/10 bis 1/20 der enzyminaktivierenden Gallensäurenkonzentration (z.B. 300 µM/l = 0,125 g/l CDC (59)) signifikante morphologische Veränderungen der Leberzellstruktur festgestellt. Vor allem wurden Veränderungen der Zellkompartimentierung beobachtet:

Alterationen der Mitochondrien, des Golgi-Apparates, des endoplasmatischen Reticulums, Verlust der Mikrovilli, Erweiterung der Gallenkanälchen, ... usw. (18,20,47,59,69). Auch werden hämolytische Eigenschaften der Gallensäuren von verschiedenen Autoren beschrieben (6,16,64). Von Interesse in diesem Zusammenhang ist außerdem, daß bei Cholestase Membrankomponenten sowohl im peripheren Blut (16) als auch

in den Gallenthromben (7) nachgewiesen werden.

Da es sich hierbei vornehmlich um Veränderungen an der Membran handelt, läßt dies darauf schließen, daß Gallensäuren in pathologischen Konzentrationen oder beim Gallenstau vorzugsweise einen zerstörerischen Einfluß auf Plasmamembranen der Zellen ausüben.

Wahrscheinlich sind die Gallensäuren dabei je nach Stärke ihres hydrophoben Charakters (vgl. 2.2.6.) in der Lage, mit lipophilen Membranbestandteilen (z.B. Cholesterin) Mizellen zu bilden und diese dadurch aus der Membran herauszulösen. Dafür spricht, daß die am stärksten hydrophobe Gallensäure DC in der Literatur auch als die am stärksten toxische Gallensäure beschrieben wird: Z.B. führt DC nach Inkubation mit präparierter Plasmamembran zu einer vollständigen Zerstörung des Membrangefüges, TC hinterläßt dagegen noch eine membranähnliche Morphologie (13,21).

Die von Lee und Whitehouse (44) beschriebene Entkopplung der oxydativen Phosphorylierung nach Inkubation von DC und CDC mit isolierten Mitochondrien ist demnach möglicherweise auch auf eine unspezifische Detergentienwirkung der Gallensäuren und nicht auf eine spezifische Enzyminaktivierung zurückzuführen. Nach der chemiosmotischen Hypothese von Mitchell (61) kann nämlich eine geringfügige Störung des Membrangefüges der Mitochondrien wahrscheinlich bereits ausreichen, um den für die ATP-Bildung notwendigen H^+-Gradienten quer zur Mitochondrienmembran zu stören. Außerdem kann es durch die Gallensäureeinwirkung zu einer Desintegration des komplexen Enzymsystems kommen.

Zudem konnten Liersch und Hesse (49) nach Leberperfusionen mit DC, CDC, TCDC den in vitro nachgewiesenen toxischen Effekt der Gallensäuren auf die Mitochondrien am intakten Organ nicht nachweisen.

Es scheint sich also eher um eine direkte Einwirkung der Gallensäuren auf die Mitochondrienmembran zu handeln.

Schlußfolgerung:

Zur weiteren Untersuchung bezüglich der Hepatoxizität von Gallensäuren wäre daher eine eingehende Studie der Wechselwirkung zwischen Gallensäuren und Plasmamembranen vorzuschlagen. Unter physiologischen Bedingungen ist die Leberzelle den Gallensäuren in höheren Konzentrationen (bis 14 g/l) an der canaliculären Seite ausgesetzt. Außerdem unterscheiden sich die sinusoidale und die canaliculäre Membran in vielen Eigenschaften voneinander (58,78). Es sollte daher versucht werden, die Gallensäuren von der canaliculären Seite her an die Leberzelle heranzuführen.

Im Übrigen sollte berücksichtigt werden, daß in der Natur stets ein Gemisch aus verschiedenen Mono-, Di- und Trihydroxygallensäuren vorliegt, die sich gegenseitig beeinflussen können: Es ist z.B. bekannt, daß TLC die Aufnahme von TC in die Hepatozyten hemmen kann (78). TC wiederum ist in der Lage, eine Membranschädigung durch TLC aufzuheben (43). Es wäre deshalb empfehlenswert, auch Kombinationen von Gallensäuren in ihrer Wirkung zu untersuchen.

7. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluß der Gallensäuren Desoxycholsäure (DC), Chenodesoxycholsäure (CDC), Ursodesoxycholsäure (UDC), Taurocholsäure (TC) und Dehydrocholsäure (DHC) auf die Zellenzyme LDH-1, LDH-5, GOT und GPT geprüft und mögliche unterschiedliche Wirkungen der Gallensäuren aufgezeigt werden. Zu diesem Zweck wurden die Enzyme und Gallensäuren in 1,0 mM EDTA, 2,5 mM Tris/HCl, pH=7,5 gelöst und miteinander bei 25°C mindestens 60 Minuten lang inkubiert. In gewissen Zeitabständen wurden die Aktivitäten der mit Gallensäuren inkubierten Enzyme bestimmt und mit den Enzymaktivitäten von Kontrollansätzen verglichen. Dabei erhielt man folgende Befunde:

Das leberspezifische Enzym LDH-5 wurde durch DC, CDC und UDC mit einer Abstufung der Intensität in folgender Reihenfolge inaktiviert: DC>CDC>UDC. TC und DHC zeigten keine signifikante Wirkung. Da das mit weniger hydrophoben Elementen ausgestattete Isoenzym LDH-1 lediglich durch DC schwach in seiner Aktivität beeinträchtigt wurde und da die Hydrophobizität der Gallensäuren in der Reihenfolge DC>CDC>UDC>TC>DHC abnimmt, beruht die Inaktivierung der LDH wahrscheinlich auf hydrophoben Wechselwirkungen. Der beobachtete zeitabhängige Inaktivierungsmechanismus wurde auf die Quartärstruktur der LDH zurückgeführt.

Der Aktivitätshemmung von GPT, die durch alle Gallensäuren außer DHC in etwa gleichem Ausmaß inaktiviert wurde, liegt demnach ein anderer Wirkungsmechanismus zugrunde. Auch bei GOT scheint es sich um einen anders gearteten Wirkungsmechanismus zu handeln, da nur CDC und UDC diese Transaminase schwach in ihrer Aktivität zu beeinflussen vermochten. GOT und GPT wurden initial inaktiviert. Dies könnte darauf zurückgeführt werden, daß diese beiden Transaminasen im Gegensatz zu LDH nur aus einer Peptidkette bestehen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit legen den Schluß nahe, daß ein Gallensäureanstieg im Serum bei Lebererkrankungen nicht ausreicht, um die Bestimmung der Transaminasen in der Leberdia-

gnostik zu verfälschen.

Es ist ebenso unwahrscheinlich, daß der Zellstoffwechsel (z.B. bei Cholestase) durch die Inaktivierung von LDH-1, LDH-5, GOT und GPT durch Gallensäuren beeinträchtigt wird, da diese Enzyme in vitro - wenn überhaupt - erst bei sehr hohen Gallensäurekonzentrationen inaktiviert wurden und da die Gallensäuren bei Anwesenheit von lipophilen Proteinen (z.B. Membranproteinen) und Lipiden eher mit diesen Substanzen wechselwirken. Außerdem werden in der Literatur bereits bei 1/10 bis 1/20 der enzyminaktivierenden Gallensäurekonzentrationen Leberzellschäden beschrieben, die vornehmlich auf den membrantoxischen Einfluß der Gallensäuren zurückgeführt werden können.

Die unterschiedlich schädigende Wirkung der beiden in der Gallensteintherapie verwendeten Gallensäuren CDC und UDC, wie sie vor allem in klinischen Feldstudien beobachtet worden war, zeigte sich auch hier in ihrer Wirkung auf LDH-5. Die von vielen Autoren angenommene Toxizität von CDC über ihr Abbauprodukt LC (Lithocholsäure) spielte in den Versuchen dieser Arbeit keine Rolle. CDC selbst mußte also stärker toxisch wirken als UDC. Dies führte zu der Annahme, daß der alleinige Unterschied zwischen CDC und UDC, die Stellung der OH-Gruppe am C_7-Atom, die unterschiedliche Toxizität dieser Gallensäuren bewirkt. Da sich durch die 7-α-Orientierung der Hydroxylgruppe der hydrophobe Charakter von CDC verstärkt, sind hydrophobe Kräfte anscheinend bei der toxischen Wirkung von CDC in der Leber entscheidend. Daraus ergibt sich die Schlußfolgerung, die Gallensäure UDC ihrem 7-α-Epimer CDC in der Therapie vorzuziehen.

8. TABELLARISCHER ANHANG

Zur Umrechnung der Gallensäurekonzentrationen g/l -- mM/l:

Tab. 8: Desoxycholsäure-Na_4-Salz MG = 415

0,1	g/l =	0,24 mM/l
0,25		0,60
0,5		1,21
1,0		2,41
2,5		6,03
5,0		12,05
10,0		24,10

1000 µM/l = 0,42 g/l

Tab. 9: Chenodesoxycholsäure und Ursodesoxycholsäure MG = 393

0,1	g/l =	0,26 mM/l
0,25		0,64
0,5		1,27
1,0		2,55
2,5		6,36
5,0		12,72
10,0		25,45

1000 µM/l = 0,39 g/l

Tab.10: Taurocholsäure Na-Salz MG = 538

0,1	g/l =	0,19 mM/l
0,25		0,47
0,5		0,93
1,0		1,86
2,5		4,65
5,0		9,29
10,0		18,59

1000 µM/l = 0,54 g/l

Tab.11: Dehydrocholsäure MG = 388

0,1	g/l =	0,26 mM/l
0,25		0,64
0,5		1,29
1,0		2,58
2,5		6,44
5,0		12,89
10,0		25,77

1000 µM/l = 0,33 g/l

Tab. 12: LDH-5, inkubiert mit DC, CDC, UDC, TC und DHC (gelöst in Tris/HCl), Aktivität nach t=60' in U/l± SEM, Proteinkonzentration (LDH-5) im Ansatz nach Zugabe der Gallensäuren: 11 mg/l, pH=7,5 (n=2, bei DC n=3)

Konz. (g/l)	DC	CDC	UDC	TC	DHC
Kontrolle	432±13	418±32	244±3	414±3	431±44
0,25	119±42	115±25	--	--	406± 9
0,5	0±0	12± 9	--	--	406± 9
1,0	0±0	0±0	76±10	370±70	437±30
2,5	0±0	0±0	0±0	365±55	443±26
5,0	--	0±0	0±0	415±38	--
10,0	--	0±0	0±0	361±23	--

Tab. 13: LDH-5, inkubiert mit DC (im Standardmedium gelöst), Enzymaktivität in U/l ± SEM, Proteinkonzentration (LDH-5) im Inkubationsmedium nach DC-Zugabe: 11 mg/l, pH=7,5 (n=3)

Konz. (g/l)	t=60'
Kontrolle	414±38
1,0	78±43
2,5	0±0
5,0	13±9
10,0	13±9

Tab. 14: LDH-5, inkubiert mit DC (im Standardmedium + Albumin (26 g/l) gelöst), Aktivität in U/l±SEM, Proteinkonzentration (LDH-5) im Ansatz nach DC-Zugabe: 11 mg/l, pH=7,5 (Einzelversuch)

	t=5'	t=15'	t=25'	t=35'	t=60'	t=2h30'
Kontrolle	640	664	689	640	600	517
3,0 g/l DC + 26 g/l Albumin	677	640	664	640	688	591

Tab. 15: LDH-1, inkubiert mit DC, CDC, UDC, TC,DHC (gelöst in Tris/HCl), Aktivität nach t=60' in U/l±SEM, Proteinkonzentration (LDH-1) im Ansatz nach Zugabe der Gallensäuren: 14 mg/l, pH= 7,5 (n=2, bei DC n=3)

Konz. (g/l)	DC	CDC	UDC	TC	DHC
Kontrolle	319±15	423±67	340±32	355±54	455±27
0,25	278±32	--	--	--	468±17
0,5	283±21	--	--	--	468±17
1,0	258±15	374±67	306± 8	324±49	506±26
2,5	192±14	378±64	324± 3	341±72	482±34
5,0	--	404±54	306±16	267±38	--
10,0	--	419±35	296±17	324±67	--

Tab. 16: GOT, inkubiert mit DC, CDC, UDC, TC, DHC (gelöst in Tris/HCl), Aktivität nach t=60' in U/l±SEM, Proteinkonzentration (GOT) nach Zugabe der Gallensäuren: 10 mg/l, pH=7,5 (n=2)

Konz. (g/l)	DC	CDC	UDC	TC	DHC
Kontrolle	146±9	293±36	227±16	253±49	228±9
0,25	146±4	--	--	--	217±5
0,5	140±3	--	--	--	217±8
1,0	142±8	253±26	208±16	238±44	206±9
2,5	146±5	257±30	201±11	228±39	211±9
5,0	--	261±35	205±10	225±45	--
10,0	--	207±18	188±13	228±43	--

Tab. 17: GPT, inkubiert mit DC, CDC, UDC, TC, DHC (gelöst in Tris/HCl), Aktivität nach t=60' in U/l±SEM, Proteinkonzentration (GPT) nach Zugabe der Gallensäuren: 26 mg/l, pH=7,5 (n=2)

Konz. (g/l)	DC	CDC	UDC	TC	DHC
Kontrolle	105±1	227±1	214±12	193±3	194±9
0,25	97±2	--	--	--	200±8
0,5	86±5	--	--	--	194±4
1,0	74±3	109±2	157±18	112±4	211±8
2,5	55±4	67±6	110±9	107±5	186±5
5,0	--	52±3	65±5	74±1	--
10,0	--	40±3	34±2	53±4	--

9. LITERATURVERZEICHNIS

1. BARBARA, L., E. RODA and A. RODA:
The medical treatment of cholesterol gallstones experience with chenodeoxycholic acid.
Digestion 14, 209-219 (1976)

2. BELL, G.D., B. Whitney and R.H. DOWLING:
Gallstone dissolution in man using chenodeoxycholic acid.
Lancet 1972 II, 1213-1216

3. BERGMEYER, H.U. und E. BERNT:
Lactat-Dehydrogenase.
in: Bergmeyer, H.U.: Methoden der enzymatischen Analyse, 3. Auflage, S. 607, Weinheim: Verlag Chemie 1974

4. BERGMEYER, H.U. und E. BERNT:
Glutamat-Oxalacetat-Transaminase.
in: Bergmeyer, H.U.: Methoden der enzymatischen Analyse, 3. Auflage, S. 769, Weinheim: Verlag Chemie 1974

5. BERGMEYER, H.U. und E. BERNT:
Glutamat-Pyruvat-Transaminase.
in: Bergmeyer, H.U.: Methoden der enzymatischen Analyse, 3. Auflage, S. 785, Weinheim: Verlag Chemie 1974

6. BERLINER, F. and R. SCHOENHEIMER:
Hemolytic and antihemolytic properties of bile acids and sterols in relation to their structure.
J. Biol. Chem. 124, 525-541 (1938)

7. BIAVA, C.: Studies on cholestasis. The fine structure and morphogenesis of hepatocellular and canalicular bile pigment.
Lab. Invest. 13, 1099-1104 (1964)

8. BISHOP, M.J., J. Everse and N.O. KAPLAN:
Identification of lactate dehydrogenase isoenzymes by rapid kinetics.
Proc. Natl. Acad. Su. (US) 69, 1761-1765 (1972)

9. BOEHRINGER MANNHEIM: Glutamate-oxaloacetate transaminase. (GOT) Biochemica Information II
Cat. No. 15335 1975

10. CAREY, M.C. and D.M. SMALL:
Micelle formation by bile salts.
Physical-chemical and thermodynamic considerations.
Arch. Intern. Med. 130, 506-525 (1972)

11. CAREY, M.C. and A.P. KORETSKY:
Self-association of unconjugated bilirubin-IX-α in aqueous solution at pH 10.0 and physical-chemical interactions with bile salt monomers and micelles.
Biochem. J. 179, 675-689 (1979)

12. CHAN, W.W.-C. and K. MOSBACH:
Effects of subunit interaction on the activity of lactate dehydrogenase studied in immobilized enzyme systems.
Biochemistry 15, 4215-4222 (1976)

13. COLEMAN, R., G. HOLDSWORTH and O.S. VYVODA:
Effects of different bile salts upon the composition and morphology of a liver plasma membrane preparation. Deoxycholate is more membrane damaging than cholate and its conjugates.
Biochim. Biophys. Acta 465, 68-76 (1977)

14. CRIDDLE, R.S., C.H. MCMURRAY and H. GUTFREUND:
Factors controlling the interconversion of enzyme-substrate compounds of pig heart lactate dehydrogenase.
Nature 220, 1091-1095 (1968)

15. DANZINGER, R.G., A.F. HOFMANN and L.S. SCHOENFIELD:
Dissolution of cholesterol gallstones by chenodeoxycholic acid.
N. Engl. J. Med. 286, 1-8 (1972)

16. DE BROE, M.E., M. BORGERS and R.J. WIEME:
The separation and characterization of liver plasma membrane fragments circulating in the blood of patients with cholestasis.
Clin. Acta 59, 369-379 (1975)

17. DENNIS, D. and N.O. KAPLAN:
D- and L-lactic acid dehydrogenase in lactobacillus plantarum.
J. Biol. Chem. 235, 810-818 (1960)

18. DESMET, V.J.: Morphologic and histochemical aspects of cholestasis.
in: Popper, H. and F. Schaffner: Progress in liver diseases, Vol. 4, 97-99, New York: Grune and Stratton 1972

19. DIETSCHY, J.M.: Symposium on bile acids.
Arch. Intern. Med. 130, 473-648 (1972)

20. DREW, R. and B.G. PRIESTLY:
Failure of hypoactive hypertrophic smooth endoplasmic reticulum to produce cholestasis in rats.
Toxicol. Appl. Pharmacol. 45, 191-199 (1978)

21. EHRHARD, J.C. and J. CHAUVEAU:
Differential solubilization of proteins, phospholipids, free and esterified cholesterol of rat liver cellular membranes by sodium deoxycholate.
Biochim. Biophys. Acta 375, 434-445 (1975)

22. EVERSE, J. and N.O. KAPLAN:
Lactat dehydrogenases: Structure and function and related areas of molecular biology advances in enzymology, Vol. 37, 61-135, New York, London, Sydney, Toronto: John Wiley&Sons 1973

23. FEDOROWSKI, T., G. SALEN, F.G. ZAKI, S. SHEFER and E. H. MOSBACH:
Comparative effects of ursodeoxycholic acid in the rhesus monkey.
Gastroenterology 74, 75-81 (1971)

24. FISHER, M.M., R. MAGNUSSEN and K. MIYAI:
Bile acid metabolism in mammals.
I. Bile acid-induced intrahepatic cholestasis.
Lab. Invest. 21, 83-91 (1971)

25. GADACZ, T.R., R.N. ALLAN and E. MACH:
Impaired lithocholate sulfation in the rhesus monkey: A mechanism for chenodeoxycholate toxicity.
Gastroenterology 70, 1125-1129 (1976)

26. GONZALEZ, M.C., E. SUTHERLAND and F.R. SIMON:
Regulation of hepatic transport of bile salts. Effect of protein synthesis inhibition on excretion of bile salts and their binding to liver surface membrane fractions.
J. Clin. Invest. 63, 684-694 (1979)

27. GRIFFIN, J.H. and R.S. CRIDDLE:
Substrate-inhibited lactate dehydrogenase reaction mechanism and essential role of dissociated subunits.
Biochemistry 9, 1195-1205 (1970)

28. HANSEN, R.F., G.C. WILLIAMS and H.L. SHARP:
Hepatic lesions and hemolysis following administration of 3α-7α-12α-trihydroxy-5β-cholestan-26oyl-taurine to rats.
J. Lab. Clin. Med. 90, 536-548 (1977)

29. HARMS, V.: Biomathematik
Statistik und Dokumentation, 2. Aufl.
Kiel: Harms Verlag 1977

30. HARTLEY, G.S.: Aqueous solutions of paraffin-chain salts. A study in micelle formation.
in: Actualités Scientifiques et Industrielles
Paris: Hermann&Cie 1936

31. HELENIUS, A. and K. SIMONS:
The binding of detergents to lipophilic and hydrophilic proteins.
J. Biol. Chem. 247, 3656-3661 (1972)

32. HENRY, D. and H. HECK:
Porcine heart lactate dehydrogenase.
J. Biol. Chem. 244, 4375-4381 (1969)

33. HOENIG, K.: Elimination fremder Verbindungen durch die Leber.
in: Kühn, H.A. und H. Wernze: Klinische Hepatologie, 2.12-2.18
Stuttgart: Thieme 1979

34. HOFMANN, A.F.: The enterohepatic circulation of bile acids in man.
in: Stollerman, G.H.: Adv. Intern. Med.
Chicago: Year Bk. Med. 1975

35. HOFMANN, A.F.: Störungen des Gallensäurestoffwechsels in: Kühn, H.A. und H. Wernze: Klinische Hepatologie, 3.75-3.83, Stuttgart: Thieme 1979

36. HOLSTI, P.: Experimental cirrhosis of the liver in rabbits induced by gastric instillation of desiccated whole bile. Acta Path. Microbiol. Scand. Suppl.112, 1-67 (1956)

37. HOPPE-SEYLER, F.: Physiologische Chemie, Bd. 2, 275-324 Berlin: August Hirschwald Verlag 1877

38. ISER, J.H., R.H. DOWLING and H.Y.J. MOK: Chenodeoxycholic acid treatment of gallstones: a follow up report and analysis of factors influencing response to therapy. N. Engl. J. Med. 293, 378-383 (1975)

39. KAKIS, G. and I.M. YOUSEF: Pathogenesis of lithocholate- and taurolithocholate-induced intrahepatic cholestasis in rats. Gastroenterology 75, 595-607 (1978)

40. KÜHN, H.A. und H. WERNZE: Physiologie und Pathologie der Gallensekretion. in: Kühn, H.A. und H. Wernze: Klinische Hepatologie, 2.25-2.37 Stuttgart: Thieme 1979

41. KURTZ, W., P. JANKA, L. SWOBODA und U. LEUSCHNER: Nichtsulfatierte Gallensäuren in der Leberzelle der Ratte. Untersuchungen zur Toxizität der Chenodesoxycholsäure. Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. 83, 496-499 (1978)

42. KUTZ, C. and A. SCHULTE:
Effectiveness of ursodeoxycholic acid in gallstone therapy. (letter)
Gastroenterology 73, 632-633 (1977)

43. LAYDEN, T.J. and J.L. BOYER:
Taurolithocholate-induced cholestasis: Taurocholate but not dehydrocholate reverses cholestasis and bile canaliculi membrane injury.
Gastroenterology 73, 120-128 (1977)

44. LEE, M.J. and M.W. WHITEHOUSE:
Inhibition of electron transport and coupled phosphorylation in liver micelles by cholanic (bile) acids and their conjugates.
Biochem. Biophys. Acta 100, 317-328 (1965)

45. LEHNERT, T. and H.H. BERLET:
Selective inactivation of lactate dehydrogenase of rat tissue by sodium deoxycholate.
Biochem. J. 177, 813-818 (1979)

46. LEUSCHNER, U., L. SWOBODA, W. KURTZ und P. JANKA:
Nichtsulfatierte Gallensäuren in der Leberzelle der Ratte. Untersuchungen zur Toxizität der Chenodesoxycholsäure.
Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. 83, 496-499 (1978)

47. LEUSCHNER, U., M. SCHNEIDER und L. KORTE:
Der Einfluß von Chenodesoxycholsäure und Ursodesoxycholsäure auf die Leberstruktur der Ratte.
Z. Gastroenterologie 17, 244-256 (1979)

48. LEVI, A.S. and N.O. KAPLAN:
The role of the reduced diphosphopyridine nucleotide in the reactivation of dogfish muscle lactate dehydrogenase.
Biochim. Biophys. Res. Comm. 45, 1615-1621 (1971)

49. LIERSCH, M. und W. HESSE:
Untersuchungen zum Stoffwechsel der Leber während der Cholestase.
Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. 80, 429-432 (1975)

50. MAKINO, J., S. NAKAGAWA and K. MASHIMO:
Conjugated and unconjugated serum bile acid levels in patients with hepatobiliary diseases.
Gastroenterology 56, 1033-1093 (1969)

51. MAKINO, S., C. TANFORD and J.A. REYNOLDS:
The binding of deoxycholate and triton X-100 to proteins.
J. Biol. Chem. 248, 4926-4932 (1973)

52. MAKINO, J., K. SHINOZAKI and K. YOSHINO:
Dissolution of cholesterol gallstones by ursodeoxycholic acid.
Jpn. J. Gastroenterol. 72, 690-691 (1975)

53. MARKERT, C.L. and E.J. MASSARO:
Lactate dehydrogenase isoenzymes: Dissociation and denaturation by dilution.
Science 162, 695-697 (1968)

54. MATON, P.N. und R.H. DOWLING
in: V Bile acid meeting:
Biologische Effekte der Gallensäuren, 3. Arbeitssitzung, Kongressbericht 26, Freiburg, Br.: Dr. Falk 1978

55. MAZER, N.A., M.C. CAREY, R.F. KWASNICK and G.B. BENEDEK:
Quasielastic light scattering studies of aqueous biliary lipid systems. Size, shape and thermodynamics of bile salt micelles.
Biochemistry 18, 3064-3075 (1979)

56. MCBAIN, E.L. and E. HUTCHINSON:
Solubilization and related phenomena.
New York: Academic Press 1955

57. MCBAIN, J.W., R.C. MERILL and J.R. VINOGRAD:
The solubilization of water-insoluble dye in solutions of aqueous detergents.
J. Amer. Chem. Soc. 63, 670-676 (1941)

58. MEIJER, D.K.F., R.J. VONK and J.G. WEITERING:
The influence of various bile salts and some cholephilic dyes on Na^{+}-, K^{+}- and Mg^{2+}-activated ATPase of rat liver in relation to cholestatic effects.
Toxicol. Appl. Pharmacol. 43, 597-612 (1978)

59. MIYAI, K., V.M. PRICE and M.M. FISHER:
Bile acid metabolism in mammals. Ultrastructural studies on the intrahepatic cholestasis induced by lithocholic and chenodeoxycholic acid in the rat.
Lab. Invest. 24, 292-301 (1971)

60. MIYAI, K., A.L. RICHARDSON, W. MAYR and N.B. JAVITT:
Subcellular pathology of rat liver in cholestasis and choleresis induced by bile salts. 1. Effects of lithocholic, 3-B-hydroxy-5-cholenoic, cholic and dehydrocholic acids.
Lab. Invest. 36, 249-258 (1977)

61. MÜLLER, O.: Grundlagen der Biochemie, Stoffwechsel der Organismen, 1. Aufl., Band 2, S. 17-32 Stuttgart: Thieme 1978

62. NAKAGAWA, S., I. MAKINO and T. ISHIZAKI: Dissolution of cholesterol gallstones by ursodeoxycholic acid. Lancet 1977 II, 367-369

63. OPPEL, U.G. und B. RÜGER: Biomathematik, medizinische Statistik und Dokumentation, 1. Aufl., München: Rathgeber 1975

64. PALMER, R.H.: Hemolytic effects of steroids Nature 201, 1134-1135 (1964)

65. PALMER, R.H.: Bile acids, liver injury and liver disease. Arch. Intern. Med. 130, 606-618 (1972)

66. PESCE, A., T.P. FONDY, F. STOLZENBACH, F. CASTILLO and N.O. KAPLAN: The comparative enzymology of lactic dehydrogenasis. J. Biol. Chem. 242, 2151-2167 (1967)

67. PFLEIDERER, G.: Lactat-Dehydrogenase in: Hoppe-Seyler, Thierfelder: Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse, 10. Aufl., Band 6, Teil A, S. 356-363, Berlin, Göttingen, Heidelberg, New York: Springer 1964

68. POPPER, H. and F. SCHAFFNER: Die Leber. Struktur und Funktion, 87-92 Stuttgart: Thieme 1961

69. POPPER, H. and F. SCHAFFNER:
Pathophysiology of cholestasis.
Human Pathol. 1, 24-32

70. PREISIG, R., G. BAUMGARTNER and J. REICHEN:
Influence of chemical structure on hepatocellular uptake
in: Falk Symposium Nr. 24 1976

71. ROEPKE, R.R. and H.L. MASON:
Micelle formation in aqueous solutions of bile salts.
J. Biol. Chem. 133, 103-108 (1940)

72. ROGG, T.: Vergleichende Untersuchung der Gallensäuren Desoxycholsäure, Chenodesoxycholsäure, Ursodesoxycholsäure, Taurocholsäure bezüglich ihrer Wirkung auf isolierte Hepatozyten und perfundierte Rattenlebern.
vorgelegte Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin, medizinische Fakultät (klinische Medizin) der Eberhard-Karls-Universität Tübingen, 1982

73. SAVIOLI, G., R. LUGLI and R. SALATI:
Changes induced by ursodeoxycholic acid on the lipid composition of bile and plasma subjects with cholesterol gallstones. Cholelitholytic effect (abstr.)
Digestion 16, 345 (1977)

74. SCHMID, M.: Leber
in: Siegenthaler, W.: Klinische Pathophysiologie, 3. Aufl., 793-826
Stuttgart: Thieme 1976

75. SCHMIDT, F.W. und E.SCHMIDT:
Grundlagen der enzymatischen Analyse
in: Bergmeyer, H.U.: Methoden der enzymatischen Analyse
5. Aufl., Band I, 11-32
Weinheim/Bergstr.: Verlag Chemie 1970

76. Schmidt, F.W. und E. SCHMIDT:
Kleine Enzym-Fibel,
Schriftenreihe: Diagnostika Boehringer,
Mannheim 1974

77. SCHMIDT, F.W. und U. BÄR:
Enzymdiagnostik: Grundlagen und Anwendung
in: Kühn, H.A. und H. Wernze: Klinische Hepatologie, 3.95-3.105
Stuttgart: Thieme 1976

78. SCHWENK, M., L.R. SCHWARZ und H. GREIM:
Taurolithocholate inhibits taurocholate uptake by isolated hepatocytes at low concentrations
Naunyn-Schmiedberg's Arch. Pharmacol.
298, 175-179 (1977)

79. SEWING, K.-FR.: Erkrankungen des Magen-Darm-Traktes.
in: Fülgraff, G. und D. Palm: Pharmakotherapie, Klinische Pharmakologie,
3. Aufl., S. 151, Stuttgart, New York:
Gustav Fischer 1979

80. SMALL, D.M.: Molecular association in biological and related systems.
American Chemical Society Symposium
1967, Florida
Adv. Chem. Ser. 84, 31-52 (1968)

81. SMALL, D.M. and W.H. ADMIRAND:
Solubility of bile salts.
Nature 221, 265-267 (1969)

82. SMALL, D.M., S.A. PENKETT and D. CHAPMAN:
Studies on simple and mixed bile salt micelles by nuclear magnetic resonance spectroscopy.
Biochim. Biophys. Acta 173, 178-189 (1969)

83. STIEHL, A., P. CZYGAN and B. KOMMERELL:
Ursodeoxycholic acid versus chenodeoxycholic acid: a comparison of their effectiveness on bile acids and cholesterol saturation in bile of patients with cholesterol gallstones (abstr.)
Digestion 16, 323-324 (1977)

84. STIEHL, A., P. CZYGAN, B. KOMMERELL, H.J. WEIS and K.H. HOLTERMÜLLER:
Ursodeoxycholic acid versus chenodeoxycholic acid. Comparison of their effects on bile and bile lipid composition in patients with cholesterol gallstones.
Gastroenterology 75, 1016-1020 (1978)

85. STIEHL, A., P. CZYGAN, B. KOMMERELL, H.J. WEIS und K.H. HOLTERMÜLLER:
in: V Bile acid meeting:
Biologische Effekte der Gallensäuren, 2. Arbeitssitzung
Kongressbericht 26, Freiburg, Br.:
Dr. Falk 1978

86. STRANGE, R.C., G.J. BECKETT and J.W. PERCY-ROBB:
Nuclear and cytosolic distribution of conjugated cholic acid and radiolabelled glycocholic acid in rat liver.
Biochem. J. 178, 71-78 (1979)

87. TANFORD, C.: The hydrophobic effect: Formation of micelles and biological membranes
2. Aufl., New York: Wiley 1980

88. THISTLE, J.L. and A.F. HOFMANN:
Efficacy and specificity of chenodeoxycholic acid therapy for dissolving gallstones.
N. Engl. J. Med. 289, 655-659 (1973)

89. TRAUTSCHOLD, I. und E. WERLE:
Transaminasen
in: Hoppe-Seyler/Thierfelder:
Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse, 10. Aufl., Band 6, Teil B, 326-408
Berlin, Heidelberg, New York: Springer 1966

90. WACHSMUT, H. und G. PFLEIDERER:
Biochemical studies on crystalline isoenzymes of lactate dehydrogenase from human organs
Biochem. Z. 336, 545-556 (1963)

91. WEIS, H.J.: Nebenwirkungen von CDC und UDC
in: V Bile acid meeting:
Biologische Effekte der Gallensäuren, Kongressbericht 26, Freiburg, Br.:
Dr. Falk 1978

92. WIELAND, H. und M. SORGE:
Untersuchungen über Gallensäuren
II. Mitteilung. Zur Kenntnis der Choleinsäure.
Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 97, 1-27 (1916)

93. WILKINSON, J.H.: LDH-1
in: Bergmeyer, H.U., Methoden der enzymatischen Analyse, 3. Aufl., S. 638,
Weinheim: Verlag Chemie 1974

94. ZEWE, V. and H.J. FROMM:
Kinetic on rabbit lactate dehydrogenase.
II. Mechanism of the reaction.
Biochemistry 4, 782-792 (1965)

LEBENSLAUF

Am 25.8.1955 wurde ich, Cornelie Rodloff, als Tochter des Physikers Dr. Günther Rodloff und seiner Ehefrau Nellie, geborene Funke, in Stuttgart geboren.

Nach vierjährigem Besuch der Volksschule in Witten/Ruhr wechselte ich 1966 ans Städtische Schillergymnasium Witten über, wo ich am 2. Juni 1975 das Abitur bestand.

Hierauf nahm ich im Wintersemester 1975/76 an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen das Studium im Fach Humanmedizin auf. Für die gesamte Studiendauer war ich dort immatrikuliert.

Die ärztliche Vorprüfung legte ich am 22. März 1978 ab. Den ersten Abschnitt der ärztlichen Prüfung bestand ich am 22. März 1979, den zweiten am 21. August 1981. Den letzten Studienabschnitt, das Praktische Jahr, schloß ich am 22. Oktober 1982 mit dem dritten Abschnitt der ärztlichen Prüfung ab.